

Molekulare Determinanten der Dephosphorylierung und Genaktivierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Julia Staab
geb. Polaczek

aus Homberg/ Efze

Marburg a. d. Lahn, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Mai 2011 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer in der Abteilung Kardiologie am Biomedizinischen Forschungszentrum der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen
Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

„Molekulare Determinanten der Dephosphorylierung und Genaktivierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1“

selbstständig, ohne fremde Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten und angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

(Ort, Datum)

Julia Staab

Zusammenfassung

Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie, die aus sechs funktionellen Domänen aufgebaut ist. Obgleich die Linker-Domäne, die zwischen der aminoterminal davon gelegenen DNA-Binde- und der carboxyterminal positionierten SH2-Domäne lokalisiert ist, einen zentralen Bereich in der modularen Molekülorganisation beansprucht, ist über deren physiologische Bedeutung bislang vergleichsweise wenig bekannt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Linker-Domäne von STAT1 einen Einfluss auf DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität besitzt; jedoch konnte der molekulare Mechanismus dafür nicht identifiziert werden. Um einen besseren Einblick in die Rolle der Linker-Domäne im Zusammenhang von DNA-Bindung und Zielgenerkennung zu gewinnen, wurden Punktmutanten einzelner konservierter Aminosäurereste des STAT1-Moleküls generiert und diese funktionell charakterisiert. Die Substitutionsmutation eines konservierten Glutamatrests in Position 500 führte zu einer verbesserten transkriptionellen Aktivität nach IFN γ -Stimulation, während sich Phosphorylierungs- und Kernakkumulationskinetik sowie DNA-Bindeaffinität nicht vom Wildtyp-Molekül unterschieden. Die IFN α -abhängige Zielgenaktivierung war im Gegensatz zur IFN γ -vermittelten Signalantwort jedoch supprimiert. Dieses zeigt, dass die Linker-Domäne ursächlich an einer differentiellen, ligandenabhängigen Genaktivierung beteiligt ist. Des Weiteren konnte eine Beteiligung der Linker-Domäne an der Dephosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden. Die Mutation eines hochkonservierten Lysinrests in Position 525 führte zum Verlust einer für die Stabilisierung der parallelen Dimerkonformation essentiellen Salzbrücke mit einem kritischen Glutamatrest der SH2-Domäne des gleichen Monomers. Dieser Stabilitätsverlust scheint das Gleichgewicht der Konformere im STAT1-Dimer zugunsten der antiparallelen Dimerkonformation zu verschieben, wobei die antiparallele Konformation von der STAT1-inaktivierenden Phosphatase bevorzugt wird. Durch Dephosphorylierungsassays konnte gezeigt werden, dass die K525A-Mutante gegenüber dem Wildtyp-Protein ein bevorzugtes Substrat der nukleären T-Zell-Phosphatase ist. Dies resultiert nach Stimulation mit IFN γ in einer erhöhten *In-vivo*- und *In-vitro*-Dephosphorylierungsrate, verminderten Tyrosin-Phosphorylierung, reduzierten Kernakkumulation und einer konsekutiv verminderten Genaktivierung *in vivo*. Um einen besseren Einblick in die DNA-Bindung von STAT1 zu gewinnen,

wurde zusätzlich eine weitere Mutante der DNA-Bindedomäne charakterisiert, die im Gegensatz zu anderen DNA-Bindemutanten nicht in direktem Kontakt mit der DNA-Helix steht, aber in ihrer Affinität zur DNA inhibiert ist. Wie mit Hilfe dieser Strukturmutante gezeigt werden konnte, haben nicht nur Aminosäuren, die in direktem Kontakt mit der DNA stehen einen Einfluss auf die DNA-Bindung, sondern auch solche, die an der Bildung der dreidimensionalen Domänenstruktur beteiligt sind.

Summary

STAT proteins are members of an evolutionary highly conserved protein family. They consist of a modular domain structure with six well-characterized functional domains. The linker domain, which connects the amino-terminal DNA-binding domain with the carboxy-terminal SH2-domain, is known to be engaged in DNA binding and transcriptional activation. However, the molecular mechanisms regulating transcriptional modulation by the linker domain are largely unknown. To gain a deeper insight into the role of this domain in DNA-binding and transcriptional activation, point mutants in the linker domain of STAT1 were generated and functionally characterized. The substitution of a conserved glutamate residue in position 500 resulted in enhanced transcriptional activation of IFN γ -sensitive genes, whereas tyrosine phosphorylation and nuclear accumulation were both similar to the wild-type protein. In contrast, target gene activation after stimulation with IFN α was significantly reduced. This observation shows that the linker domain is responsible for ligand-dependent differential gene activation. Furthermore, it was demonstrated that the linker domain contributes to the inactivation of tyrosine-phosphorylated STAT1. Mutation of a highly conserved lysine residue in position 525 led to the disruption of a salt bridge with a glutamate residue in the SH2 domain of the same monomer. This salt bridge appears to be essential for the stabilization of parallel STAT1 dimers. Loss of this stabilization leads to a shift of STAT1 dimers to the antiparallel conformation. As compared to the wild-type protein, destabilizing this interaction resulted in a mutant with diminished nuclear accumulation, reduced tyrosine phosphorylation and target gene activation upon stimulation of cells with IFN γ . Further experiments including *in vitro* assays demonstrated that the inactivating T-cell phosphatase preferentially dephosphorylates STAT1-K525A as compared to the wild-type protein. To get further insight of the DNA-binding of STAT1 a point mutant of the DNA-binding domain was characterized. In contrast to other DNA-binding mutants this mutant has no direct contacts to DNA, but nevertheless showed a reduced affinity to DNA. This mutant shows that the architecture of the whole domain is required for functional DNA-binding.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Absorption, Ampere
Å	Angström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumine</i>)
CBP	CREB-bindendes Protein
CCD	coiled-coil-Domäne
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
Ci	Curie
CIS	engl.: <i>cytokine inducible SH2-containing protein</i>
CREB	engl.: <i>cAMP response element-binding protein</i>
CRM-1	engl.: <i>chromosome region maintenance-1</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos-modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)

EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (engl.: <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay
EtOH	Ethanol
FBS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-1	Intrazelluläres-Adhäsions-Molekül-1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-Alpha/Beta-Rezeptor
IFNGR	Interferon-Gamma-Rezeptor
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulierter Faktor
ISGF3	IFN-stimulierter Genfaktor 3
ISRE	engl.: <i>IFNα-stimulated response element</i>
JAK	Janus-Kinase
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LB	engl.: <i>lysogeny broth</i>
LD	Linker-Domäne

LiCl	Lithiumchlorid
LMB	Leptomycin B
LMP2	engl.: <i>low molecular mass polypeptide 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli, Meter
M	Molar
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MH1	MAD Homologie 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
MIG	engl.: <i>monokine induced by IFNγ</i>
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natrium-ortho-vanadat
ND	Aminoterminal Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
Nmi	engl.: <i>N-Myc-interactor</i>
NPC	nukleärer Porenkomplex
NTF-2	Nukleärer Transportfaktor 2
OD	Optische Dichte
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween-20

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT
Poly-dIdC	engl.: <i>Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)acid</i>
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RanBP-1	Ran-bindendes Protein 1
RanGAP	Ran/GTPase aktivierendes Protein
RanGEF	engl.: <i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfat</i>)
sec	Sekunde(n)
SH2	Src-Homologie 2
SHP-1	SH2-Domänen beinhaltende Phosphatase 1
SHP-2	SH2-Domänen beinhaltende Phosphatase 2
SOCS	Suppressoren des Zytokin-Signalwegs (engl.: <i>suppressors of cytokine signaling</i>)
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
SV40 TAg	engl.: <i>Simian vacuolating Virus 40 large T antigen</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TC-PTP	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (engl.: <i>transforming growth factor receptor β</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-propandiol
U	Units
UV	Ultraviolett

V Volt
WT Wildtyp

Proteinogene Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	MW [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutamat	Glu	E	
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1	Die Familie der STAT-Proteine und Zytokine.....	1
1.2	STAT-defiziente Mäuse.....	4
1.3	Der Jak-STAT-Signalweg.....	5
1.4	Struktur und Domänen von STAT1.....	9
1.5	Nukleocytoplasmatischer Transport von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1.....	13
1.6	Zielsetzung.....	16

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1	Material.....	17
2.1.1	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	17
2.1.2	Chemikalien.....	17
2.1.2.1	Laborchemikalien.....	17
2.1.2.2	Radiochemikalien.....	19
2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien.....	19
2.1.4	Enzyme, Zytokine und Reaktions-Kits.....	20
2.1.5	Primer und Oligonukleotide.....	24
2.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.7	Bakterienstämme und Medien.....	27
2.1.8	Antikörper.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellkulturmethoden.....	28
2.2.1.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	28
2.2.1.2	Transfektion von Säugerzellen.....	29
2.2.1.3	Behandlung von Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren.....	29
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2.1	Mutagenese.....	30
2.2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	30
2.2.2.3	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien.....	30
2.2.2.4	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	31
2.2.2.5	Sequenzierung.....	31
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmungen von DNA.....	32

2.2.2.7	Herstellung von Zellextrakten.....	32
2.2.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.2.9	Western-Blot und immunchemische Proteindetektion.....	34
2.2.2.10	Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.2.2.11	Reporter-gen-Assay.....	35
2.2.2.12	Dephosphorylierungs-Assay.....	37
2.2.2.13	<i>In-vitro</i> -Phosphorylierungs-Assay.....	37
2.2.2.14	Gelretardationsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA).....	38
2.2.2.15	RNA-Isolation.....	39
2.2.2.16	cDNA-Synthese.....	40
2.2.2.17	<i>Real-time</i> -PCR.....	40
2.2.2.18	Immunpräzipitation.....	40
2.2.3	Statistik.....	41
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Identifizierung von konservierten Aminosäureresten in der Linker-Domäne von STAT1.....	42
3.2	Charakterisierung von STAT1-K525A.....	42
3.2.1	Das Phosphorylierungsniveau von STAT1-K525A ist vermindert.....	43
3.2.2	STAT1-K525A besitzt eine inhibierte Genaktivierung aufgrund der verminderten Phosphorylierung.....	50
3.2.3	Die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K525A betrifft alle untersuchten STAT1-vermittelten Zytokine.....	54
3.2.4	Das verminderte Phosphorylierungsniveau von STAT1-K525A lässt sich durch Vanadat-Zugabe kompensieren.....	58
3.2.5	Experimente <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> beweisen, dass es sich bei STAT1- K525A um eine Dephosphorylierungsmutante handelt.....	61
3.3	Charakterisierung von STAT1-E500A.....	63
3.3.1	Die Einführung eines Alaninrests an Position 500 von STAT1 führt zu einer verbesserten transkriptionellen Aktivität nach IFN γ -Stimulation.....	64
3.3.2	Die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A ist nicht auf eine Veränderung des Phosphorylierungsniveaus oder der Kernakkumulation zurückzuführen.....	69

3.3.3	Die DNA-Bindung von STAT1-E500A ist vergleichbar mit der von STAT1-WT.....	74
3.4	Charakterisierung von STAT1-F364A.....	77
3.4.1	<i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Experimente der STAT1-Mutante F364A zeigen eine normale Dephosphorylierungskinetik.....	78
3.4.2	STAT1-F364A besitzt eine normale Kinetik der Kernakkumulation....	80
3.4.3	STAT1-F364A besitzt eine verminderte Affinität der DNA-Bindung bei erhaltener GAS-Erkennung.....	84
3.4.4	STAT1-F364A besitzt eine verminderte transkriptionelle Aktivität.....	88
4.	DISKUSSION	
4.1	Die Linker-Domäne von STAT1 ist an der Transkription und der Dephosphorylierung beteiligt.....	91
4.2	Charakterisierung einer DNA-Bindemutante mit verminderter DNA-Bindung aber erhaltener GAS-Erkennung.....	104
4.3	Ausblick.....	107
5.	LITERATUR	
	Danksagung.....	123
	Lebenslauf.....	125
	Anhang.....	126

1. Einleitung

1.1 Die Familie der STAT-Proteine und Zytokine

Bei den STAT-Proteinen (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) handelt es sich um eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie, die eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen wie der Immunantwort, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose spielt. Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um überwiegend im Cytoplasma lokalisierte Transkriptionsfaktoren, die durch Zytokin-stimulation aktiviert werden (Levy und Darnell, 2002). STAT-Proteine wurden erstmals in den 1990er Jahren im humanen Interferon-Signalweg entdeckt (Fu et al., 1992; Schindler et al., 1992a). Sie wurden seitdem im Schleimpilz *Dictyostelium*, in Nematoden und Insekten (Yan et al., 1996; Kawata et al., 1997; Liu et al., 1999; Barillas-Mury et al., 1999) sowie in Vertebraten (Oates et al., 1999; Pascal et al., 2001; Sung et al., 2003) gefunden. Die humane STAT-Familie besteht aus 7 Mitgliedern: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Im menschlichen Genom sind *stat1* und *stat4* auf Chromosom 2, *stat3*, *stat5a* und *stat5b* auf Chromosom 12 und *stat2* und *stat6* auf Chromosom 17 lokalisiert (Copeland et al., 1995; Darnell, 1997).

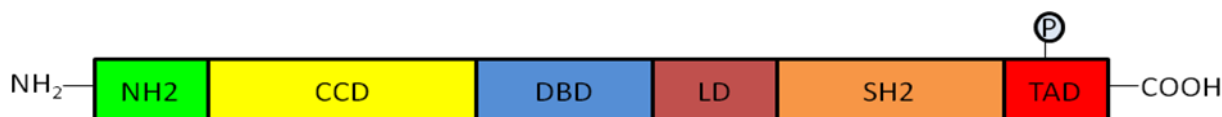


Abb. 1.1: Domänenstruktur der STAT-Proteine. NH2: aminoterminal Domäne, CCD: Coiled-coil-Domäne, DBD: DNA-Bindedomäne, LD: Linker-Domäne, SH2: Src-homology-Domäne; TAD: Transaktivierungsdomäne, P: Phosphotyrosinrest.

Alle Mitglieder der STAT-Familie sind zwischen 750-850 Aminosäuren lang und besitzen ein Molekulargewicht von 80-113 kDa. Charakteristisch ist ihr modularer Aufbau aus sechs funktionellen Domänen (**Abb. 1.1**): der aminoterminalen- (NH2-), der Coiled-coil- (CCD; auch Vier-Helix-Bündel genannt), der DNA-Binde-, der Linker-, der Src-homology- (SH2-) und der carboxyterminalen Transaktivierungs-Domäne, wobei jede Domäne an unterschiedlichen Funktionen beteiligt ist (Darnell, 1997; Levy und Darnell, 2002). In der Transaktivierungsdomäne (TAD) von STAT1, 2, 3, 5a, 5b und 6 befindet sich zudem ein hochkonservierter Tyrosinrest, der von Jak-Kinasen

phosphoryliert wird und für die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine essentiell ist (Shuai et al., 1993a; Vinkemeier et al., 1998).

Die Komplexität der STAT-Familie wird weiterhin durch differentielles Spleißen oder proteolytischen Abbau von STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 erhöht (Schindler et al., 1992a; Schaefer et al., 1995; Wang et al., 1996). So kommen z. B. STAT1 und STAT3 jeweils in den Isoformen α und β vor. In beiden Fällen handelt es sich um Spleißvarianten desselben Genortes, wobei die β -Isoform am carboxy-terminalen Ende trunkiert ist. Dies beeinflusst vor allem die transkriptionelle Aktivität, da durch das Spleißen ein bei STAT1, 3, 5a und 5b konservierter Serinrest, der von Serin-Threonin-Kinasen phosphoryliert werden kann, entfernt wird. Dieser Serinrest ist wichtig für eine maximale transkriptionelle Aktivität (Horvath, 2000; Decker und Kovarik, 2000; Lödige et al., 2005).

Die Aktivierung aller in Säugern vorkommenden STAT-Proteine erfolgt durch Bindung eines oder mehrerer Zytokine an ihre entsprechenden Transmembranrezeptoren. Diese Rezeptorbindung löst eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen aus, die von Kinasen der Janus-Familie (Jak) katalysiert werden (Levy und Darnell, 2002). Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine bzw. Glykoproteine mit einer Länge von 100-200 Aminosäuren. Sie fungieren als extrazelluläre Botenstoffe und übertragen ihre Information über membranständige Rezeptoren in das Innere ihrer Zielzellen. Dabei lösen sie eine Signaltransduktionskaskade aus, die zu einer Änderung des Genexpressionsprofils in der Zelle führt. Zytokine spielen deshalb eine wichtige Rolle bei Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen sowie bei der Kontrolle des Immunsystems. Gegenwärtig sind weit mehr als 100 verschiedene Zytokine beschrieben, doch fehlt eine einheitliche Nomenklatur (Schooltink und Rose-John, 2002). Zur Superfamilie der Zytokine gehören Interleukine, Wachstumsfaktoren, Interferone und Chemokine, die durch ihre funktionellen und strukturellen Merkmale in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Callard und Gearing, 1994; Thomson, 1998; Loppnow, 2001).

Ein für diese Arbeit wichtiges Zytokin ist der epidermale Wachstumsfaktor (EGF). Dieser bindet mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor (*Epidermal growth factor receptor*). EGFR ist ein Mitglied der ErbB-Familie (*Erythoblastic leukemia viral oncogene homology*), einer Unterfamilie von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Wie alle RTKs besteht der EGF-Rezeptor aus einer extrazellulären, Liganden-bindenden Domäne, einer einzelnen Transmembranhelix und einer cyto-

plasmatischen Domäne, wobei Letztere über eine intrinsische Kinaseaktivität verfügt. Die Bindung von EGF führt zu einer Rezeptordimerisierung, Aktivierung der intrinsischen PTK (Protein-Tyrosin-Kinase), Tyrosin-Autophosphorylierung und anschließender Bindung verschiedener Signalproteine (Bogdan und Klämbt, 2001). Die ersten Komponenten intrazellulärer Signalkaskaden sind zumeist Proteine, die über ihre SH2- oder PTB-Domänen (*phosphotyrosine-binding domain*) von den Phosphotyrosinresten des EGF-Rezeptors rekrutiert werden (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Dabei kann die Phosphorylierung von STAT-Proteinen, insbesondere von STAT1, STAT3 und STAT5, direkt über die Bindung der SH2-Domäne an den Rezeptor erfolgen oder aber über externe Tyrosinkinasen, wie Jak1, Jak2 oder Tyk2 (Leaman et al., 1996). Die Stimulation des EGFR mit EGF führt zur Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und Jak1 (Ramana et al., 2000). Diese bilden einen heterodimeren Komplex, der nach Kernakkumulation an die STAT-Bindungssequenz SIE (*c-sis-inducible element*) bindet (Park et al., 1996; Leaman et al., 1996). Außerdem können STAT-Proteine auch direkt als Substrate für einige Non-Rezeptor-Kinasen, wie Scr oder Abl, fungieren.

Die für diese Arbeit wichtigste Zytokingruppe ist die der Interferone. Interferone werden in zwei Gruppen eingeteilt: Typ-I- ($\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\tau$, $\text{IFN}\omega$) und Typ-II-Interferone ($\text{IFN}\gamma$) (Platanias, 2005). Typ-I-Interferone besitzen antivirale Eigenschaften, die durch die Aktivierung von natürlichen Killer-Zellen zustande kommen, wohingegen die Typ-II-Interferone als immunmodulatorische Zytokine mit breiter antimikrobieller Aktivität angesehen werden. Des Weiteren wird den Interferonen eine antiproliferative Aktivität zugeschrieben. Eine weitere Funktion der Interferone ist die Regulation der Expression von Bestandteilen des MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Alle Interferone können MHC-I-Moleküle über einen von IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) abhängigen Weg induzieren (Chang et al., 1992), wohingegen der Aufbau des MHC II ausschließlich durch $\text{IFN}\gamma$ über CIITA (*MHC Class II Transactivator*) gesteuert wird (Mach et al., 1996; Boehm et al., 1997; Loppnow, 2001).

Die Interferon-Signalwege werden durch deren Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren ausgelöst. Dabei binden Typ-I-Interferone, die nach Virusinfektion in Leukozyten und Fibroblasten produziert werden, an den Interferon- α -Rezeptor (IFNAR). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten: IFNAR1 und IFNAR2, die auf der Oberfläche von kernhaltigen Zelltypen exprimiert werden (Novick et al., 1994; Platanias, 2005).

Nach Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen in T-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten erfolgt die Transkription von $\text{IFN}\gamma$ (Boehm et al., 1997; Frucht et al., 2001). $\text{IFN}\gamma$ als einziges Typ-II-Interferon bindet an einen eigenen Rezeptor, den Interferon- γ -Rezeptor (IFNGR). Dieser wird ebenfalls an der Zelloberfläche sämtlicher kernhaltiger Zellen, nicht aber der Erythrozyten, exprimiert (Langer und Pestka, 1988). Bei IFNAR und IFNGR handelt es sich um Klasse-II-Zytokinrezeptoren. Sie bestehen aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer die Zellmembran einmal durchquerenden Transmembran-Domäne sowie einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne. Da die Rezeptoren selbst keine Tyrosinkinaseaktivität besitzen, sind Proteine mit einer Kinaseaktivität, wie z.B. Janus-Kinasen (Jak), an sie gekoppelt (Bach et al., 1997).

1.2 STAT-defiziente Mäuse

Die biologische Bedeutung der einzelnen STAT-Proteine wurde durch Experimente mit STAT-defizienten Mäusen ermittelt. STAT6 wird z. B. ausschließlich durch IL-4 und IL-13 aktiviert und reguliert die T-Helfer-Zell-Entwicklung durch Induktion von T_H2 -Zellen. Das Fehlen von STAT6 in Mäusen führt zur Blockierung der Differenzierung von T_H2 -Zellen und einem Defekt der antikörpervermittelten Immunantwort (Kaplan et al., 1996a; Takeda et al., 1997b; O'Shea, 1997). STAT4-Knockout-Mäuse sind lebensfähig, fruchtbar und zeigen eine normale Hämatopoese, jedoch ist die IL-12-Antwort gestört. STAT4 wird durch IL-12 in T-Zellen aktiviert und stimuliert die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen des Immunsystems. $\text{STAT4}^{-/-}$ -Mäuse besitzen einen Defekt der Differenzierung der T-Helfer-Zellen zu T_H1 -Zellen (Kaplan et al., 1996b; Takeda und Akira, 2000; Wurster et al., 2000).

STAT5a-Knockout-Mäuse zeigen bemerkenswert wenig Defekte. Sie zeigen eine normale Entwicklung und entsprechen in Größe, Gewicht und Fruchtbarkeit Wildtyp(WT)-Mäusen. Einzig die Brustentwicklung ist gestört, dadurch ist das Säugen für Weibchen nicht möglich (Liu et al., 1997). Des Weiteren ist STAT5a wichtig für die T-Zell-Proliferation und der Knockout führt zu schweren Autoimmunerkrankungen (Moriggl et al., 1999). Aufgrund der hohen Homologie von STAT5a und 5b wurde zunächst irrtümlich angenommen, dass das Fehlen des einen Proteins durch das jeweils andere ausgeglichen werden kann. STAT5a/b-Doppel-Knockout-Mäuse

zeigen einen prominenteren Phänotyp als die Einzelmутanten. Mäuse, die kein STAT5a/b exprimieren, zeigen eine Unterdrückung der T-Zell-Proliferation nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und unterscheiden sich deutlich in Größe und Gewicht von WT-Mäusen. Des Weiteren sind die Weibchen unfruchtbar (Liu et al., 1997; Udy et al., 1997; Teglund et al., 1998; Takeda und Akira, 2000).

Die Untersuchung von STAT3-Knockout-Mäusen ist nicht möglich, da STAT3 an der Embryonalentwicklung beteiligt ist und ein Fehlen zur Degeneration des Embryos zwischen dem sechsten und siebten Tag führt (Takeda et al., 1997a; O'Shea, 1997). In adulten STAT3-negativen Zellen wird die Zellteilung und Zellproliferation unterdrückt (Alonzi et al., 2001; Takeda und Akira, 2000). Anhand von konditionellen kardioselektiven STAT3-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass STAT3 eine protektive und Hypertrophie-induzierende Funktion in Kardiomyozyten besitzt (Jacoby et al., 2003).

STAT1 und STAT2 sind essentiell für die Interferon-vermittelte Immunantwort. Bei STAT2-defizienten Mäusen ist die durch Typ-I-Interferon stimulierbare Signaltransduktion gehemmt, jedoch wird eine Immunantwort auf bakterielle Infektionen ausgelöst (Bluyssen und Levy, 1997; Park et al., 2001; Takeda und Akira, 2000; Levy und Darnell, 2002). STAT1-Knockout-Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen sowie für Tumorbildung und -wachstum (Shankaran et al., 2001), sonst sind sie in ihrer Entwicklung nicht beeinträchtigt. Die Typ-I- und Typ-II-IFN-vermittelte Signaltransduktion ist bei STAT1-Knockout-Mäusen zwar vollständig beeinträchtigt, aber die Regulation durch andere Zytokine bleibt bestehen (Durbin et al., 1996; Merez et al., 1996).

1.3 Der Jak-STAT-Signalweg

Der am besten untersuchte Signalweg mit Beteiligung der STAT-Proteine ist der Jak-STAT-Signalweg; er wurde während des Studiums der Interferone entdeckt (Darnell et al., 1994; Schindler und Darnell, 1995). Der Jak-STAT-Signalweg stellt eine Möglichkeit dar, extrazelluläre Signale in den Zellkern zu übertragen und dort eine Veränderung der Genexpression zu bewirken. Nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor erfolgt eine Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors, wodurch die Janus-Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert werden (**Abb. 1.2**). Derart aktivierte

Jaks transphosphorylieren Tyrosinreste im intrazellulären Teil der Rezeptoren. Diese phosphorylierten Tyrosinreste der Rezeptoren ermöglichen die Rekrutierung von STAT-Proteinen sowie von anderen Signalmolekülen über Bindung ihrer SH2-Domänen (Darnell et al., 1997). Anschließend werden die STATs durch Jaks an einem in der STAT-Familie invarianten Tyrosinrest in der carboxyterminalen SH2-Domäne phosphoryliert (Shuai et al., 1993a). Je nachdem welches Zytokin die Signalkaskade ausgelöst hat, führt die Tyrosinphosphorylierung zu einer Homo- oder Heterodimerisierung der STATs, die daraufhin innerhalb weniger Minuten im Zellkern akkumulieren (Melen et al., 2001; Fagerlund et al., 2002), um nach Bindung an spezifischen STAT-Bindestellen in den Enhancer- oder Promotorregionen von STAT-Zielgenen deren Induktion zu initiieren (Shuai et al., 1992; Darnell et al., 1994).

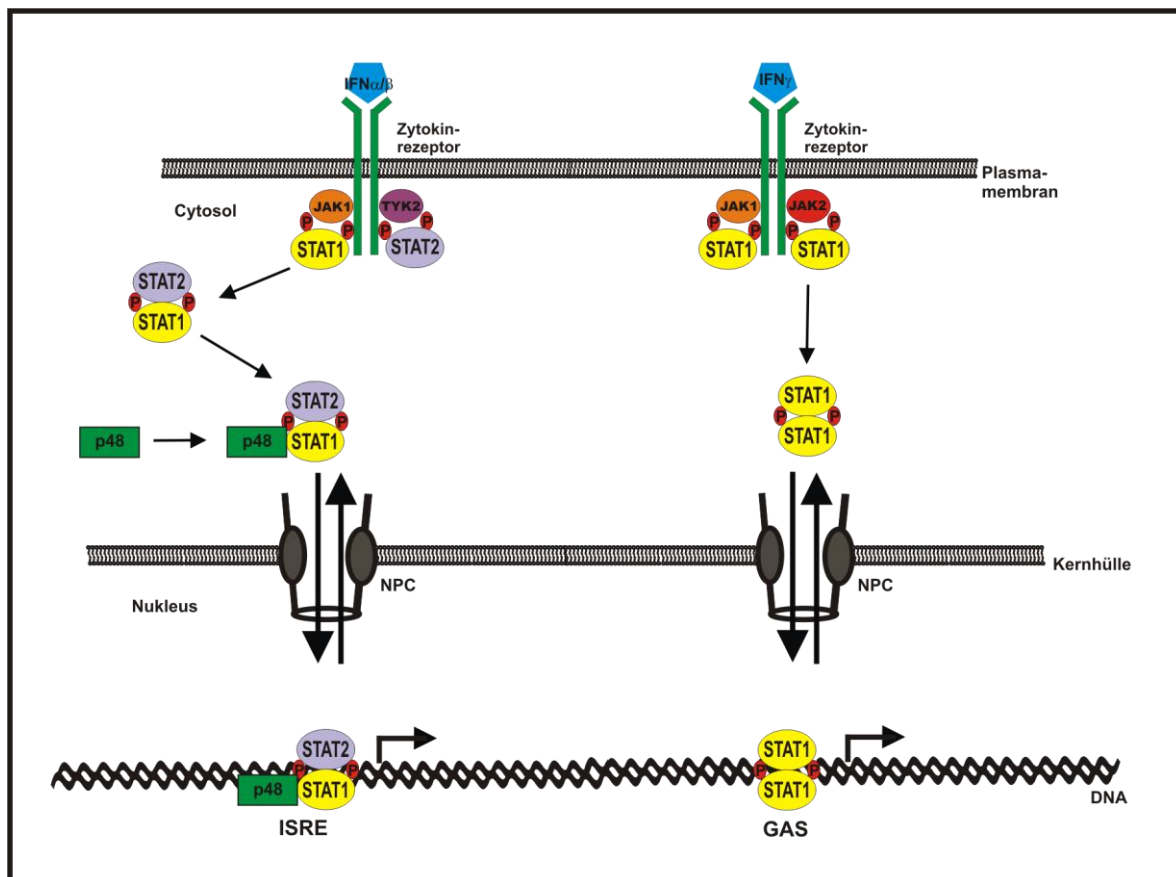


Abb. 1.2: Aktivierung von STAT-Zielgenen durch unterschiedliche Zytokinstimulation. Nach Bindung von IFN α/β bzw. IFN γ an ihren Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. Die Aktivierung führt zur Bildung von STAT1-Homodimeren (IFN γ) oder STAT1/2-Heterodimeren (IFN α/β). Die Komplexe werden in den Zellkern transportiert und binden dort an spezifische Zielsequenzen.

Die Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ führt bei STAT1 zu einer Homodimerisierung. STAT1-Dimere binden spezifisch an palindrome DNA-Sequenzen, sogenannte GAS-Stellen (*Gamma-activated sites*) in $\text{IFN}\gamma$ -regulierten Zielgenen. Stimuliert man hingegen mit $\text{IFN}\alpha$, bildet sich der heterotrimere ISFG3-Komplex (*IFN-stimulated gene factor 3*). Dieser Komplex besteht aus einem STAT1-STAT2-Heterodimer mit p48 und bindet ebenfalls spezifisch an palindrome DNA-Sequenzen, den ISRE-Stellen (*IFN α -stimulated gene response element*) (Darnell et al., 1994; Horvath, 2000).

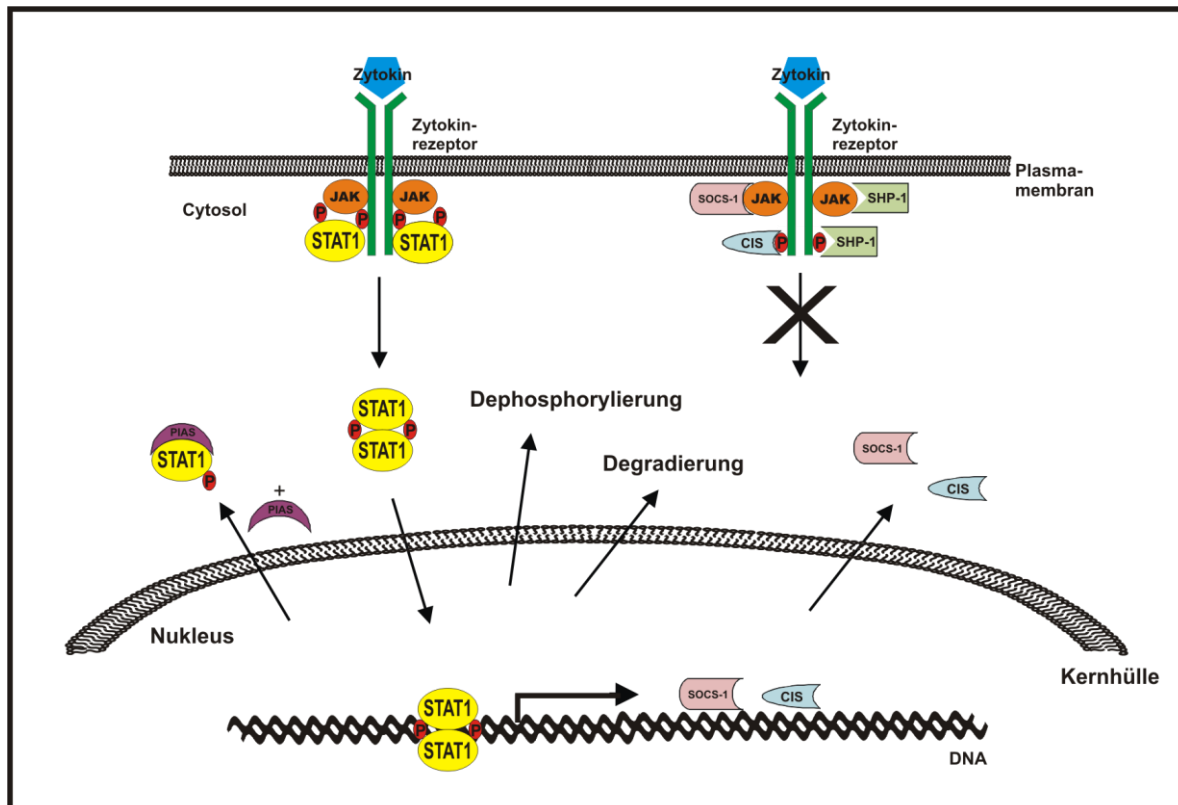


Abb. 1.3: Mechanismen der Negativregulation des Jak-STAT-Signalweges. Die Liganden-induzierte Dimerisierung des Zytokinrezeptors führt zur Aktivierung von Jak-Kinasen und zur Bildung aktivierter STAT-Dimere, die im Nukleus als Transkriptionsfaktoren wirken. Die Aktivierung von SOCS-Proteinen wird dadurch induziert. Diese hemmen die Transkription auf zwei Wegen: SOCS-1 bindet direkt an Jaks und inhibiert deren katalytische Aktivität, während CIS direkt an den Rezeptor bindet und dadurch die Rekrutierung von STAT inhibiert. SHP-1 ist an der Dephosphorylierung der Jaks oder des aktivierten Rezeptors beteiligt. STAT-Proteine werden durch PIAS-Proteine nach einem unbekannten Mechanismus inaktiviert. Des Weiteren können STAT-Proteine durch Degradierung und Dephosphorylierung inaktiviert werden.

Neben der Signaltransduktion des Jak-STAT-Signalweges spielt dessen Negativregulation eine große Rolle, da eine anhaltende Zielgenaktivierung oder dessen Fehlregulation zu Krankheiten des Immunsystems oder zu Krebs führen kann. Die

Inaktivierung kann dabei unter anderem durch cytoplasmatische und nukleäre Phosphatasen, SOCS-Proteine (*Suppressor of cytokine signaling*) und PIAS-Proteine (*Protein inhibitor of activated STAT*) erfolgen (**Abb. 1.3**). Die für die Deaktivierung notwendigen Proteine werden häufig durch STATs selbst transkriptionell reguliert (Starr und Hilton, 1999; Levy und Darnell, 2002).

Bei den SOCS-Proteinen (SOCS1-SOCS7), zu denen auch CIS (*Cytokine inducible SH2-domain-containing protein*) gehört, handelt es sich um Inhibitoren, die eine STAT-Aktivierung am Rezeptor unterdrücken. Dies geschieht bei SOCS1-7 durch Bindung an die katalytische Region der Jak-Kinasen. Dadurch wird die Autophosphorylierung der Kinasen verhindert und die Phosphorylierung der STAT-Proteine am konservierten Tyrosinrest gehemmt. Bei CIS hingegen erfolgt die Inaktivierung durch Bindung an den phosphorylierten Rezeptor selbst. STAT-Proteine und CIS konkurrieren somit um die Andockstelle am Rezeptor (Starr und Hilton, 1999; Rawlings et al., 2004). Bei den SOCS-Proteinen handelt es sich um latent cytoplasmatische Inhibitoren, im Nukleus hingegen wird die STAT-Aktivierung durch mehrere PIAS-Proteine gehemmt. PIAS1 wurde als Interaktionspartner von STAT1 identifiziert, wohingegen PIAS3 mit STAT3 agiert (Starr und Hilton, 1999). Die Interaktion von PIAS mit STAT-Dimeren verhindert die für die Transkription wichtige DNA-Bindung (Rawlings et al., 2004).

Des Weiteren wurden im Cytoplasma und im Nukleus Phosphatasen identifiziert, die für die Dephosphorylierung von aktiven STAT-Proteinen verantwortlich sind. Die Dephosphorylierung im Cytoplasma erfolgt durch Bindung der Phosphatasen an phosphorylierte Kinasen oder an den aktivierten Rezeptor. Maßgeblich sind an der Tyrosin-Dephosphorylierung im Cytoplasma die Phosphatasen SHP-1 (*SH2-containing phosphatase 1*), SHP-2 und PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) beteiligt (Levy und Darnell, 2002; Rawlings et al., 2004). Phospho-STAT-Dimere werden im Zellkern durch Phosphatasen inaktiviert. Für STAT1 und STAT3 erfolgt die Dephosphorylierung durch die präferentiell nukleär lokalisierte Phosphatase TC45 (ten Hoeve et al., 2002).

1.4 Struktur und Domänen von STAT1

Kristallographische Analysen von phosphorylierten DNA-gebundenen STAT1- und 3-Homodimeren (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998) sowie von STAT α aus *Dictyostelium* in Abwesenheit von DNA (Soler-Lozep et al., 2004) erbrachten Hinweise auf die dreidimensionalen Strukturen der Proteine. Mit dieser Hilfe konnte die Dimerisierung der STAT-Proteine über die SH2-Domänen, die Interaktion mit der DNA und die Anordnung der Helices in der Coiled-coil-Domäne aufgeklärt werden. Bei diesen Strukturinformationen fehlen jedoch die N-terminale Domäne sowie ein Teil der Transaktivierungsdomäne. Die Kristallstruktur der isolierten N-terminalen Domäne von STAT4 ist jedoch bekannt, so dass man mit Hilfe von dieser ein Modell entwickeln konnte, welches nahelegt, wie STAT1-Dimere über ihre N-Termini miteinander interagieren (Vinkemeier et al., 1998; Baden et al., 1998; Chen et al., 1998; Chen et al., 2003). Durch die Kristallisation von unphosphoryliertem STAT1 konnte diese Vermutung bestätigt werden, da die Strukturauflösung einschließlich der N-terminalen Domäne gelang (Mao et al., 2005). Des Weiteren konnte die lang diskutierte Vermutung, dass sich STAT-Proteine auch im unphosphorylierten Zustand als Dimere in Lösung befinden (Mao et al., 2005; Wenta et al., 2008), durch weitere Untersuchungen und anhand dieser Kristallstruktur bewiesen werden.

Mit diesen Kristalldaten als Grundlage konnte gezeigt werden, dass es für STAT1, und wahrscheinlich auch für weitere STAT-Proteine, zwei verschiedene Konformationen gibt. So zeigen bei der DNA-gebundenen Struktur die beiden SH2-Domänen des Dimers in die gleiche Richtung (parallel). Bei der unphosphorylierten Struktur jedoch zeigen sie in die entgegengesetzte Richtung (antiparallel). Zudem verfügt STAT1 über zwei flexible Regionen, die eine Umlagerung von der antiparallelen in die parallele Konformation und umgekehrt ermöglichen (Mao et al., 2005; Zhong et al., 2005; Mertens et al., 2006). Die parallele Konformation ist die Konformation, die STAT1 einnehmen muss, um an den Rezeptor oder die DNA zu binden. Die Bindung und die damit verbundene Stabilisierung findet bei der parallelen Konformation über reziproke SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen statt. Die antiparallele Konformation wird dagegen durch ND:ND- und durch CCD:DBD-Interaktion stabilisiert. Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass STAT1 in der parallelen Konformation eine verlängerte Phosphorylierung und eine fehlende Dephosphorylierung *in vivo* und *in vitro* aufweist.

Demnach muss STAT1 mutmaßlich die antiparallele Konformation einnehmen, um von der Phosphatase dephosphoryliert und aus dem Nukleus exportiert werden zu können (Mao et al., 2005; Zhong et al., 2005; Mertens et al., 2006; Wenta et al., 2008).

Aminoterminal Domäne

Die aminoterminal Domäne von STAT1 umfasst die ersten 135 Aminosäuren und ist nach der SH2-Domäne die am besten konservierte Domäne der STAT-Proteine. Jedoch lässt sie sich unter den verschiedenen STAT-Proteinen nicht beliebig austauschen, wie man anhand von Domänen-Austausch-Experimenten zeigen konnte (Strehlow und Schindler, 1998; Murphy et al., 2000). Die wichtigste Funktion dieser Domäne stellt die Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion dar, die für die Dimerisierung und die damit verbundene kooperative DNA-Bindung benötigt wird. Die Tetramerisierung bzw. Oligomerisierung bewirkt eine Stabilisierung der DNA-Bindungsaktivität an schwachen Promotoren (John et al., 1999). Anhand der Kristallstruktur und durch Mutationsexperimente konnte ein konservierter Phenylalaninrest in Position 77 von STAT1 (Position 81 von STAT5) identifiziert werden, der essentiell für die Oligomerisierung und Tyrosindephosphorylierung von STAT-Molekülen ist (Meyer et al., 2004a). Mutiert man diesen Rest nach Alanin ist es STAT1 nicht mehr möglich zu tetramerisieren, dadurch ist die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung gehemmt und die transkriptionelle Aktivität ist vermindert. Es wurde vermutet, dass diese Mutanten nicht fähig sind, den Konformationsshift zwischen parallel und antiparallel durchzuführen. Dieser ist jedoch zur Rekrutierung der TC45-Phosphatase notwendig. Aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass die aminoterminal Domäne maßgeblich am Konformationsshift beteiligt ist (Meyer et al., 2004a; Mao et al., 2005; Mertens et al., 2006). Zusätzlich dient die aminoterminal Domäne von STAT1 als Interaktionsfläche mit den Zytokinrezeptoren, zur Kofaktor-Bindung wie mit dem CREB-bindenden Protein (CBP/p300) und sie ist an der Bindung von PIAS1 beteiligt, welches die DNA-Bindung von phosphoryliertem STAT1 blockiert (Leung et al., 1996; Darnell, 1997; Horvath, 2000; Shuai, 2000). Des Weiteren wurde behauptet, dass die Bindung von PIAS1 an STAT1 durch die Methylierung von Arg31 in der aminoterminalen Domäne reguliert wird (Mowen et al., 2001), dieses konnte jedoch widerlegt werden (Meissner et al., 2004). Im Übergangsbereich zwischen Aminoterminus und Vier-Helix-Bündel

befindet sich ein flexibler Bereich (AS 116-142), der für die Umlagerung in die unterschiedlichen Konformationen verantwortlich ist. Dabei ist nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch die Länge dieses Bereichs von Bedeutung (Mertens et al., 2006).

Coiled-coil Domäne (CCD)

Die Coiled-coil-Domäne wird aufgrund ihrer Struktur auch als Vier-Helix-Bündel bezeichnet und besteht aus 181 Aminosäuren (136-317); sie dient ebenfalls als Protein-Protein-Interaktionsdomäne. In ihr befindet sich die zweite Interaktionsfläche, die eine Bindung des einen Monomers mit der DBD des zweiten Monomers herstellt, welches zur Stabilisierung der antiparallelen Konformation beiträgt. Mutiert man die daran beteiligten Reste (Q340, L383, G384, T385, H406, Q408 in der DBD und besonders F172 in der CCD), erfolgt, wie bei F77A, eine Destabilisierung der antiparallelen Konformation und das Molekül bleibt hyperphosphoryliert (Mao et al., 2005; Mertens et al., 2006). Des Weiteren enthält die CCD ein nukleäres Exportsignal und stellt eine potentielle Kontaktstelle für andere Transkriptionsfaktoren dar (Begitt et al., 2000). So führt z.B. die Mutation von K161A zum Verlust der Bindung an p48, welche wichtig für die Bildung des ISGF-3-Transkriptionskomplexes ist (Shuai, 2000; Bromberg und Darnell, 2000).

DNA-Bindedomäne (DBD)

Die DBD besteht aus mehreren β -Faltblättern und Schleifen und weist eine Immunglobulin-ähnliche Struktur, vergleichbar mit der DBD der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und p53, auf (Chen et al., 1998). Die wichtigste Funktion dieser Domäne stellt die Interaktion mit palindromischen DNA-Sequenzen dar. Über Protein-DNA-Wechselwirkungen tritt die DBD mit der DNA in Kontakt, und zwar so, dass jedes phosphorylierte Monomer eine halbe palindromische DNA-Stelle bindet (Chen et al., 1998). Wie anhand der Kristallstruktur gezeigt werden konnte, findet die Bindung mit der DNA über die große und kleine Furche der Doppelhelix statt. Dabei wurde gezeigt, dass die Aminosäurereste N460 und K336 mit der großen und E421 mit der kleinen Furche in Kontakt stehen (Chen et al., 1998).

Die Funktionen der DBD konnten durch Mutationsexperimente gezeigt werden. Dabei führen Mutationen in diesem Bereich zum Verlust der spezifischen DNA-Bindung (Darnell, 1997; Yang et al., 2002). Des Weiteren wurden DNA-Bindemutanten

generiert, die für diese Arbeit von Interesse sind. Durch Mutation der Reste T327R, V426H und T427H (DNA^{plus}), die durch Wasserstoffbrückenbindung maßgeblich an der DNA-Bindung beteiligt sind, erhält man eine Mutante, die sich im Gegensatz zu STAT1-Wildtyp nach IFN γ -Stimulation durch unspezifische und verlängerte Bindungen an Nicht-GAS-Bindestellen auszeichnet (Meyer et al., 2003). Dadurch zeigt sie eine verlängerte Tyrosin-Phosphorylierung und eine verlängerte Dauer der Zytokin-induzierten Kernakkumulation. Dennoch ist diese Mutante nicht in der Lage, STAT1-spezifische Zielgene zu aktivieren. Die DNA^{minus}-Mutante (V426D und T427D) stellt bezüglich der DNA-Bindung gewissermaßen das Gegenteil von DNA^{plus} dar. Durch die Mutation verliert sie jegliche Affinität zur DNA-Bindung und akkumuliert dadurch auch nicht in die Kerne Zytokin-stimulierter Zellen (Meyer et al., 2003). Außerdem konnte in der DBD ein NLS (Nukleäres Lokalisationssignal) nachgewiesen werden, das für den Import von STAT1 durch Bindung an Importin $\alpha 5$ verantwortlich ist (Meyer et al., 2002; Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002).

Linker-Domäne (LD)

Die Linker-Domäne von STAT1 umfasst die Aminosäuren 489 bis 576 und verbindet die DBD mit der SH2-Domäne (Chen et al., 1998). Die Funktion der LD ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch bewirken spezifische Mutationen in dieser Domäne eine veränderte transkriptionelle Aktivität von STAT1-Homodimeren. Des Weiteren resultieren Mutationen in der LD in einer veränderten Dissoziationsrate von DNA (Yang et al., 1999; Yang et al., 2002). Zusätzlich scheint die LD für die STAT1-Bindung an den Kernporen-Komplex und damit für die Regulation der nukleocytoplasmatischen Translokation notwendig zu sein (Marg et al., 2004).

SH2-Domäne

Die am stärksten konservierte Domäne der STAT-Proteine ist die SH2-Domäne. Sie ist für die Signalweiterleitung in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Zum einen vermittelt sie die Rekrutierung von STAT1-Monomeren an die phosphorylierten Abschnitte von membranständigen Rezeptoren oder intrazellulären Tyrosinkinasen (Shuai et al., 1994; Becker et al., 1998). Zum anderen ist die SH2-Domäne für die Homo- und Heterodimerisierung verantwortlich. Wie man anhand der Kristallstruktur von STAT1 feststellen konnte, erfolgt die Dimerisierung durch die reziproke Interaktion der SH2-Domäne des einen Monomers mit einem invarianten

phosphorylierten Tyrosinrest des zweiten Monomers (Chen et al., 1998; Shuai et al., 1993b). Dabei erkennt ein konservierter Arginin-Rest in Position 602 von STAT1 den Phosphotyrosinrest in Position 701 des kontralateralen Monomers. Die Wechselwirkung wird durch die Aminosäuren in der Nähe des Phosphotyrosins an den Positionen zwischen 701 und 708 und einem Lysinrest in der SH2-Domäne an der Position 584 von STAT1 vermittelt. Durch die wechselseitige Interaktion des Tyrosinphosphats und den SH2-Domänen beider Monomere werden sehr stabile Homodimere in paralleler Konfiguration gebildet (Wenta et al., 2008). Mutiert man den Arginin-Rest in Position 602 verliert STAT1 seine Fähigkeit zur Dimerisierung (Shuai et al., 1994; Chen et al., 1998).

Transaktivierungsdomäne (TAD)

Die TAD ist die am wenigsten konservierte Domäne der STAT-Proteine und ihre Länge variiert zwischen 40-200 Aminosäuren (Paulson et al., 1999). Wahrscheinlich trägt diese Tatsache zur Zielgenspezifität von STAT-Proteinen bei. Bei STAT1 besitzt die TAD eine Länge von 67 Aminosäuren und in ihr befindet sich der kritische Tyrosinrest 701, der von den Rezeptorkinasen phosphoryliert wird und für die transkriptionelle Aktivität bedeutsam ist (Schindler et al., 1992a; Shuai et al., 1992). Des Weiteren beinhaltet die TAD von STAT1 einen konservierten Serinrest in Position 727, der für die maximale transkriptionelle Aktivität wichtig ist. In der natürlich vorkommenden Spleißvariante von STAT1 (STAT1 β) fehlt dieser Rest (Darnell et al., 1994; Darnell, 1997). STAT1 β ist zwar zur Dimerisierung und zur DNA-Bindung befähigt, jedoch ist es transkriptionell nicht aktiv und wirkt daher als negativer Regulator (Wen et al., 1995; Zhang et al., 1995; Decker und Kovarik, 2000). Darüber hinaus vermittelt die TAD Protein-Protein-Interaktionen mit CBP/p300 (Zhang et al., 1996), MCM5 (Zhang et al., 1998), BRCA1 (Ouchi et al., 2000) und NCoA1 (Litterst und Pfitzner, 2001).

1.5 Nukleocytoplasmatischer Transport von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1

STAT-Proteine wurden initial als latent im Cytoplasma lokalisierte Transkriptionsfaktoren beschrieben, denen nachgesagt wurde, dass sie erst nach ihrer Aktivierung

in den Zellkern gelangen, um dort transkriptionell zu wirken. Spätere Untersuchungen konnten dieses nicht bestätigen und gaben Hinweise auf einen nukleocytoplasmatischen Transport des unphosphorylierten STAT-Moleküles in Abwesenheit einer Zytokin-Stimulation (Meyer et al., 2004b). Allen nukleocytoplasmatischen Translokationsprozessen gemeinsam ist, dass sie die Kernmembran überwinden müssen. In der Kernmembran befinden sich nukleäre Porenkomplexe (NPC), die als Filter für den Transport höhermolekularer Proteine dienen (Mattaj und Englmeier, 1998; Weis, 1998). Kleine Moleküle passieren die Membran durch Diffusion über die Kernporen, während Moleküle mit einem Molekulargewicht über ≈ 50 kDa einen aktiven Transportprozess durch den NPC benötigen (Weis, 1998; Conti und Izaurralde, 2001). Dabei interagieren Proteine, die aktiv durch den NPC transportiert werden, über Rezeptoren, sogenannte Importine (Importrezeptoren) und Exportine (Exportrezeptoren) mit dem Porenkomplex. Für diese Interaktionen sind spezielle Sequenzen notwendig. Im Falle der Importine benötigen Interaktionsproteine (Cargo-Proteine) einen Cluster aus basischen Aminosäuren, das sogenannte nukleäre Lokalisationssignal (NLS) (Weis, 1998; Körner et al., 2003).

In den letzten Jahren konnte in der DNA-Bindedomäne von STAT1, STAT2 und STAT3 ein konserviertes NLS identifiziert werden (Melen et al., 2001; Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002). Allerdings entspricht dies nicht einem klassischen NLS und ist nur im Dimer (dimerspezifisches NLS) funktionell. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Aminoterminus essentiell für die Kernakkumulation ist, denn aminoterminal Deletionsmutanten sind nicht in der Lage nach Zytokin-Stimulation im Zellkern zu akkumulieren (Strehlow und Schindler, 1998; Meyer und Vinkemeier, 2004b). Durch Lösen der Kristallstruktur von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 ließen sich diese Beobachtungen erklären (Chen et al., 1998; Mao et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass STAT1 im Cytoplasma als Monomer und als antiparalleles Dimer vorliegt. In dieser Konformation ist das NLS maskiert, erst durch Tyrosin-Phosphorylierung und reziproke SH2-Wechselwirkung der beiden STAT1-Monomere findet eine Konformationsänderung unter Beteiligung des Aminoterminus statt und das dimerspezifische NLS ist nun frei zugänglich (Zhong et al., 2005).

Mit Hilfe des NLS können STAT1-Dimere an Importin $\alpha 5$ binden (Sekimoto et al., 1997; Nardozzi et al., 2010). Importin α bindet an Importin β , welches den Cargo-Importin α/β -Komplex in die Nähe der cytoplasmatischen Seite des NPCs bringt.

Importin β interagiert mit RanGTPase und wird in den Zellkern transportiert (Mattaj und Englmeier, 1998; Weis, 1998; Görlich und Kutay, 1999). Da es sich hierbei um einen aktiven Transport handelt, ist die Interaktion mit der GTPase Ran notwendig, da sie die nötige Energie für den Transportprozess liefert. Die Funktionalität wird dabei durch den Ran-GDP-/RanGTP-Gradienten getrieben. Ran liegt im Cytoplasma in der Ran-GDP-Form vor; im Zellkern dominiert die Ran-GTP-Form. Im Cytoplasma wird Ran-GTP durch RanBP-1 (*Ran binding protein*) und RanGAP (*Ran-GTPase activating protein*) hydrolysiert. Die Konzentration von Ran-GTP ist deshalb im Cytosol sehr gering. Ran-GDP bindet im Cytosol an NTF-2 (*Nuclear transport factor*) und dieser dimere Komplex wird in den Kern transportiert. Im Kern bindet Ran-GDP an RanGEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), der die Synthese des Ran-GTP katalysiert und zu der hohen Ran-GTP Konzentration im Zellkern beiträgt (Görlich und Kutay, 1999; Kalab et al., 2002). Ran-GTP ist für zwei Prozesse im Zellkern verantwortlich: zum einen für die Trennung des Importin-Cargo-Komplexes, und zum anderen für die Bindung des Cargo-Proteins an Exportin (Weis, 1998).

Die Dauer der Kernakkumulationsphase der STAT-Proteine hängt dabei nach DNA-Dissoziation maßgeblich von der Beteiligung nukleärer Phosphatasen ab, da nur dephosphorylierte STAT-Monomere aus dem Zellkern transportiert werden können (Haspel et al., 1996; Haspel und Darnell, 1999; Meyer et al., 2003). In der Coiled-coil-Domäne von STAT1 wurde ebenfalls ein nukleäres Exportsignal identifiziert, das an CRM-1 (*Chromosome region maintenance*) binden kann. Dieses wiederum tritt mit dem NPC in Verbindung und leitet den Export aus dem Zellkern ein. Der Export ist auch hierbei wieder von der GTPase Ran abhängig, wie Experimente mit LMB (Leptomycin B), einem Inhibitor von CRM-1, zeigten (Fornerod et al., 1997; Wolff et al., 1997; Kudo et al., 1999).

Die Annahme, dass es sich bei STAT-Proteinen um latent im Cytoplasma lokalisierte Transkriptionsfaktoren handelt, konnte mittlerweile durch mehrere Untersuchungen widerlegt werden (Braunstein et al., 2003; Meyer et al., 2004b; Lödige et al., 2005; Yang und Stark, 2008). Im unphosphorylierten Zustand liegt STAT1 als Monomer oder antiparalleles Dimer vor. Da selbst das STAT1-Monomer eine Größe von 86 kDa besitzt, kann es den NPC durch freie Diffusion kaum passieren. Trotzdem findet man STAT1-Proteine im Zellkern. Das bedeutet, dass es noch einen weiteren Transportmechanismus von STAT1 geben muss, der unabhängig von Transportfaktoren und metabolischer Energie ist. Der genaue Vorgang des Transport-

mechanismus ist nicht bekannt, aber man konnte nachweisen, dass STAT1 mit den FG-Motiven (Phenylalanin/Glycin-reiche Wiederholungen) der Nucleoporene Nup153 und Nup214 interagiert (Marg et al., 2004). Nup153 ist dabei auf der nukleären Seite der NPCs und Nup214 auf der cytoplasmatischen Seite verankert (Paulillo et al., 2005). Für den nukleären Export von unphosphoryliertem STAT1 konnten zwei unabhängige Mechanismen nachgewiesen werden. Zum einen der energieabhängige Export mit einem NES über CRM1 und einer ohne metabolische Energie (Marg et al., 2004).

1.6 Zielsetzung

Die Funktion der Linker-Domäne ist weitgehend unbekannt. Bisher konnte durch einzelne Mutationsexperimente gezeigt werden, dass die Stabilität der DNA-Bindung durch eine erhöhte Off-Rate von DNA beeinflusst ist (Yang et al., 2002). Des Weiteren führt der Stabilitätsverlust zu einer verminderten Zielgenaktivierung nach IFN γ -Stimulation. Die IFN α -Antwort ist jedoch nicht betroffen (Yang et al., 1999). In dieser Arbeit soll durch Mutation von konservierten Aminosäureresten der Linker-Domäne von STAT1 überprüft werden, welchen Einfluss diese Mutationen auf die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität haben. Zusätzlich soll durch neu zu generierende Punktmutanten ein besserer Einblick in die Rolle der Linker-Domäne im Zusammenhang von DNA-Bindung und Zielgenerkennung gewonnen werden.

In einem zweiten Versuchsteil soll die Funktion eines Phenylalaninrestes der DNA-Bindedomäne untersucht werden. Anhand eines Sequenzvergleichs der STAT-Proteine konnte festgestellt werden, dass alle STAT-Proteine an dieser Stelle im Molekül ein Isoleucin besitzen, mit Ausnahme von STAT1. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Mutation dieses Phenylalanins einen Einfluss auf die DNA-Bindung besitzt oder eine andere Funktion ermittelt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

humane Zelllinien

HeLa-S3	Humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie (von Prof. Dr. U. Vinkemeier zur Verfügung gestellt)
U3R	STAT1-defiziente Zelllinie entstanden aus 2fTGH mit rekombinantem IFN γ -Rezeptor (von Prof. Dr. U. Vinkemeier zur Verfügung gestellt)

Alle Zellkulturreagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Gibco (Karlsruhe) oder PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Laborchemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH
Borsäure	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich GmbH
BSA	Carl Roth GmbH
Digitonin	Sigma-Aldrich GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck

Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH
Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycylglycin	Sigma-Aldrich GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH
Leptomycin B	LC Laboratories, Woburn, USA
Lipopolysaccharid aus <i>E. coli</i> O111:B4 (LPS)	Sigma-Aldrich GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma-Aldrich GmbH
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH
Mangan(II)-chlorid	Carl Roth GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH

Natrium-orthovanadat	Sigma-Aldrich GmbH
Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid	Sigma-Aldrich GmbH
Pefabloc	Roche, Grenzach
2-Propanol	Carl Roth GmbH
Polyethylenglycol 8000	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Block	Carl Roth GmbH
Rotiphorese [®] Gel	Carl Roth GmbH
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH
Salzsäure	Carl Roth GmbH
Staurosporin	Sigma-Aldrich GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH
Trypton	Carl Roth GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH

2.1.2.2 Radiochemikalien

α -[³² P]-dATP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Rodgau
α -[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer
α -[³² P]-dGTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer
α -[³² P]-dTTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit entionisiertem Wasser der Millipore-Anlage Milli-Q (Millipore, Schwalbach) hergestellt. Die Anlage filtert Wasser über einen Moleküllfilter mit einer Porengröße von 0,22 μ m. Der pH-Wert einzelner Lösungen wurde mit Hilfe des pH-Meters Seven Easy (Mettler Toledo, Giessen) eingestellt. Bei Bedarf wurden einzelne Lösungen über 0,2 μ m-Filter steril filtriert.

2.1.4 Enzyme, Zytokine und Reaktions-Kits

Enzyme

AmpliTa [®] Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
Complete [™] -Mini Protease Inhibitoren	Roche, Grenzach
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>DpnI</i> -Endonuklease	Stratagene, La Jolla, USA
Epidermaler Wachstumsfaktor (human, rekombinant, mit N-terminalem GST-Tag, exprimiert in Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen)	US Biological, Swampscott, USA
Jak2 (human, rekombinant, mit N-terminalem His-Tag, exprimiert in Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen)	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA
<i>PfuUltra</i> -HF-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
peqGold DNase I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tsp509I-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Schwalbach
T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (human, rekombinant, C-terminale 11 kDa-Deletion (TCΔC11 Reste 1-317), exprimiert in <i>E. coli</i>)	Biomol International, Plymouth, USA
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

Zytokine

humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) Biomol GmbH, Hamburg

humanes Interferon α (IFN α) Biomol GmbH

humanes Interferon γ (IFN γ) Biomol GmbH

Reaktions-Kits

Die nachfolgend aufgelisteten Reaktionskits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

Absolute™-Blue-QPCR-SYBR®-Green Mix	Thermo Scientific, Dreieich
AmpliTaq® Gold DNA Polymerase, Puffer II, MgCl ₂ -Lösung	Applied Biosystems, Darmstadt
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Luciferase-Assay-System	Promega, Mannheim
peqGold Plasmid Miniprep Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH
peqGold Total RNA Kit Safety Line	PEQLAB Biotechnologie GmbH
QIAGEN Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Purification Kit	Qiagen
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Verso™ cDNA Kit	Thermo Scientific
Western Lightning Chemiluminescence Reaction Plus	Perkin Elmer Life Science, Boston

Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Expressionsvektoren sind nachfolgend aufgelistet.

Plasmid	Beschreibung	Quelle (Referenz)
pEGFP-N1	Vektor zur Expression N-terminaler GFP-Fusions-	Clontech, Mountain View, USA

	plasmide in Säugetierzellen	
pSTAT1 α -GFP ¹	humane STAT1 α -cDNA (AS 1-746) kloniert in pEGFP-N1	Begitt et al., 2000
pSTAT1 α (F364A)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar F364AF/F364AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (E500A)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E500AF/E500AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (K525A)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar K525AF/K525AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (R602L)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar R602LF/R602LR	diese Arbeit Shuai et al., 1994 Chen et al., 1998
pSTAT1 α -DNA ^{Minus}	humane STAT1 α -cDNA kloniert in pEGFP-N1 mit Mutation V426D/T427D	Meyer et al., 2003
pSTAT1 α (T385A)-GFP	Derivat von ¹ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar T385AF/T385AR	diese Arbeit Mao et al., 2005
pSTAT1 α -NES-GFP ²	Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus STAT1, dem transferierbaren NES von STAT1 (AS 367-427) und GFP	Dr. U. Vinkemeier, Nottingham, UK Lödige et al., 2005
pSTAT1 α (F364A)-NES-GFP	Derivat von ² , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar	diese Arbeit

	F364AF/F364AR	
pcDNA3.1	Säugetierzell-Expressions-plasmid	Invitrogen
pcDNA3.1-STAT1 α ³	humane STAT1 α -cDNA kloniert in pcDNA3.1	Dr. James E. Darnell, New York, USA
pcDNA3.1-STAT1 α (F364A)	Derivat von ³ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar F364AF/F364AR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α (E500A)	Derivat von ³ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar E500AF/E500AR	diese Arbeit
pcDNA3.1-STAT1 α (K525A)	Derivat von ³ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar K525AF/K525AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (Y701A)-Flag ⁴	humane STAT1 α -cDNA mit Flag-Sequenz gefolgt von einem Stop-Codon kloniert in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pEGFP-N1 mit Y701A	Meyer et al., 2002
pSTAT1 α -Flag ⁵	Derivat von ⁴ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar A701YF/A701YR	diese Arbeit
pSTAT1 α (K525A)-Flag	Derivat von ⁵ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar K525AF/K525AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (R602L)-Flag	Derivat von ⁵ , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar	diese Arbeit

	R602LF/R602LR	
pβGal	β-Galaktosidase-Expressionsvektor	Stratagene
pGAS3xLy6E	IFN γ -abhängiger Reporter-genvektor	Wen et al., 1995
pIC-339	Reporter-genvektor mit dem trunkierten Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T. van der Saag, Utrecht, Niederlande
pIC-1352	Reporter-genvektor mit dem Promoter des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P.T. van der Saag

In dieser Arbeit wurden nur Plasmide verwendet, die für STAT1 α kodieren. Aus diesem Grund wird zur weiteren Bezeichnung dieser Plasmide pSTAT1 verwendet. Der Zusatz –GFP zeigt die Verwendung von pSTAT1 α -GFP-Plasmiden an. Ohne diesen Zusatz wurde das pcDNA3.1-STAT1 α -Plasmid unter dem Akronym pSTAT1 verwendet.

2.1.5 Primer und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder bei der Firma Invitrogen (Darmstadt) oder bei Tib MolBiol (Berlin) bestellt.

Primer für die Sequenz-spezifische Mutagenese

Name	Sequenz
F364A F	5'-gaaagtcaaagtcttagctgataaagatgtgaatgag-3'
F364A R	5'-ctcattcacatctttatcagctaagactttgactttc-3'
E500A F	5'-cgatgggctcagcttcagcagtgctgagttggcag-3'
E500A R	5'-ctgccaaactcagcactgctgaaagctgagcccatcg-3'
K525A F	5'-ctgaacatgttgggagaggcgcttcttggtcctaacgcc-3'
K525A R	5'-ggcgtaggaccaagaagcgcctctcccaacatgttcag-3'

R602L F	5'-ccggggaccttcctgctgctgttcagtgagagctcc-3'
R602L R	5'-ggagctctcactgaacagcagcaggaaggtccccgg-3'
A701Y F	5'-ggccctaaaggaactggatatatcaagactgagttg-3'
A701Y R	5'-caactcagtcttgatatatccagttccttagggcc-3'
T385A F	5'-gaagttcaacattttgggcgcgcacacaaaagtgatgaac-3'
T385A R	5'-gttcatcacttttgtgtgctgcgcgccaaaatgttgaacttc-3'

Sequenzierprimer

Name	Sequenz
171r	5'-tctgcaaggtttgcatttg-3'
312f	5'-ttcagagctcgtttggtg-3'
335r	5'-tgaactggacccctgtcttc-3'
484f	5'-ccttctcctgactccacca-3'
580f	5'-catcagcaaggagcgagag-3'
611r	5'-ctccacccatgtgaatgtga-3'
680f	5'-tactccaggccaaaggaagca-3'

Primer für real-time-PCR

Name	Sequenz
hIRF1 F	5'-agctcagctgtgctgagtgta-3'
hIRF1 R	5'-tagctgctgtggtcatcagg-3'
hMIG F	5'-ccaccgagatccttatcgaa-3'
hMIG R	5'-ctaaccgacttggtgcttc-3'
hGBP1 F	5'-ggtccagttgctgaaagagc-3'
hGBP1 R	5'-tgacaggaaggctctggtct-3'
hGAPDH F	5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3'
hGAPDH R	5'-gaagatggtgatgggatttc-3'
hSTAT1 F	5'-ccgtttcatgacctcctgt-3'
hSTAT1 R	5'-tgaatattccccgactgagc-3'
hCpp32 F	5'-tggaacaaatggacctgttgacc-3'
hCpp32 R	5'-aggactcaaattctgttgccacc-3'

hICH F	5'-tccagctccaagagggttttcag-3'
hICH R	5'-gtcccttgaggcagggcatag-3'
hICE F	5'-ttgctccctagaagaagctcaaag-3'
hICE R	5'-gccttcccgaataccatgagac-3'

Oligonukleotide als Sonden für Gelretardations-Experimente

Name	Sequenz
M67 F	5'-acgtcgacatttcccgtaaatctg-3'
M67 R	5'-cagtcagatttacgggaaatgtcg-3'
GAS-nonGAS F	5'-acggcgtttccccgaaattgacggattaccccaac-3'
GAS-nonGAS R	5'-caggggtggggtaaattccgtcaatttcggggaaacg-3'
2xGAS F	5'-aagtcgtttccccgaaattgacggatttccccgaaac-3'
2xGAS R	5'-aagtcgtttcggggaaatccgtcaatttcggggaaac-3'
2xnonGAS F	5'-acggcgtttaccctaaattgacggattaccccaac-3'
2xnonGAS R	5'-caggggtggggtaaattccgtcaatttcggggtaaacg-3'

Als Größenstandard für Western-Blot-Experimente dienen die Precision-Plus-Protein™-Standards von Bio-Rad. Für Agarosegele wurde ein 100 bp DNA-Marker (Roche, Grenzach) verwendet.

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind bei der Beschreibung der einzelnen Methoden angegeben. Falls keine Angabe gemacht wurde, stammen die Verbrauchsmaterialien von den Firmen B. Braun AG (Melsungen), Biometra (Göttingen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Greiner (Frickhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark), Peqlab (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher & Schuell (Dassel) und VWR (Darmstadt).

2.1.7 Bakterienstämme und Medien

E. coli DH5 α (Stratagene)

Genotyp: *F- ϕ 80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*

E. coli XL1blue (Stratagene)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]*

Bakterienkulturen wurden entweder in LB- oder in SOC-Medium (Bioline, Luckenwalde) mit den entsprechenden Zusätzen wachsen gelassen. LB-Medium hatte die folgende Zusammensetzung: 10 g/L Bacto-Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefe. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 30 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Für LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren noch 15 g/L Agar zugesetzt. Als Selektionsmarker wurde dem LB-Medium und dem LB-Agar-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ~55 °C Kanamycin bzw. Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 μ g/mL zugesetzt.

2.1.8 Antikörper

Der polyklonale STAT1 α p91 (C-24) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurde für Western-Blot-Experimente 1:2000 in Roti-Block verdünnt. Für Immunfluoreszenzversuche wurde dieser Antikörper 1:1000 in 25 % FBS (fetales Kälberserum) in PBS verdünnt. Der Phospho-STAT1 (Tyr701) Antikörper (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) wurde für Western-Blot-Experimente in einer Verdünnung von 1:1000 in Roti-Block eingesetzt. Als Zweitantikörper für Western-Blot-Analysen diente das polyklonale Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Anti-Kaninchen-Immunglobulin aus Ziege (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:1000 in Roti-Block. Für die Detektion nach der Flag-Immunpräzipitation wurde unter anderem der monoklonale ANTI-FLAG[®] M2 Antikörper (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 in Roti-Block verwendet. Als Zweit-

antikörper diente in diesem Fall das polyklonale Meerettich-Peroxidase-konjugierte Anti-Maus-Immunglobulin aus Ziege (Invitrogen, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:5000 in Roti-Block.

Als Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Versuche wurde Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) eingesetzt. Dieses wurde 1:500 in 25 % FBS in PBS verdünnt. Die polyklonalen Anti-STAT3 (H-190) und STAT1 α p91 (C-24) Antikörper wurden für Super-Shift-Reaktionen in EMSA-Experimenten (*electrophoretic mobility shift assays*) 1:9 in PBS verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen (siehe 2.1.1) wurden im jeweiligen Medium bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten 5 %igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Vollmedium der HeLa-S3-Zellen bestand aus Quantum 101 HeLa-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin, das der U3R-Zellen aus Dulbeccos-modifiziertem Eagles-Medium (DMEM) (Biochrom) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (Biochrom), 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,04 µg/mL Puromycin (Sigma-Aldrich GmbH).

Zellpassage

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,2 g/L EDTA) inkubiert. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen 1:4 bis 1:6 verdünnt ausplattiert.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ~70 % trypsiniert, in PBS aufgenommen und durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm und 20 °C pelletiert (Biofuge fresco, Hereaus, Hanau). Das Pellet einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurde in 1 mL Einfrier-

medium (DMEM mit 20 % FBS und 10 % DMSO) resuspendiert und über Nacht in Gefriergefäßen in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Nalgene, Rochester, NY, USA) auf -80 °C gekühlt. Die Zellen wurden bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden schnell im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Vollmedium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen.

2.2.1.2 Transfektion von Säugerzellen

Der Transfer von Plasmid-DNA in die humanen Zelllinien erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des Transfektionsreagenzes MegaTran 1.0 (Origene, Rockville, USA). Die Transfektion wurde dabei nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die verschiedenen Versuche wurden die Zellen in unterschiedlichen Zellkulturschalen ausplattiert, so dass eine unterschiedliche Menge an Plasmid-DNA für die einzelnen Transfektionen verwendet wurde. Für die Transfektion in 6-Loch-Platten wurde pro Loch 1,6 µg Plasmid-DNA, für eine 10cm-Platte 9,8 µg DNA, für ein Loch einer 48-Loch-Platte 0,25 µg DNA und pro Kammer eines 8-Kammer-Objektträgers 0,1 µg DNA eingesetzt.

2.2.1.3 Behandlung von Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren

Bei allen Versuchen wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, mit 5 ng/mL humanem rekombinanten IFN α , IFN γ oder 100 ng/mL EGF stimuliert. Alle verwendeten Zytokine und Inhibitoren wurden direkt in Zellkulturmedium verdünnt. Die Staurosporin-Behandlung fand mit einer Konzentration von 1 µM und die Leptomycin-B-Behandlung (LMB) mit einer Konzentration von 10 µg/mL statt. Zur Phosphatase-Inhibition wurden die Zellen mit 0,8 mM Vanadat und 0,2 mM H₂O₂ behandelt. Die Herstellung einer wässrigen Na₃VO₄-Stammlösung (200 mM, pH 10) erfolgte wie von Kypta et al. (1988) beschrieben.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide erfolgte mit Hilfe des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Der Reaktionsansatz der PCR-Reaktion betrug 50 µL. Für einen PCR-Ansatz ausgehend von 25 ng Matrizen-DNA wurden je 125 ng des komplementären Primerpaars, 5 µL 10x Reaktionspuffer, 1 µL dNTP-Mix und 2,5 Einheiten *PfuUltra*-HF-DNA-Polymerase eingesetzt. Das Protokoll der PCR bestand aus einem 30 sec Denaturierungsschritt bei 95 °C gefolgt von 16 repetitiven Zyklen einer 30 sec Denaturierung bei 95 °C, dem Annealing-Schritt bei 55 °C für 1 min und dem Elongations-Schritt für 14 min bei 68 °C. Die amplifizierten Plasmide wurden 1 h bei 37 °C unter Zugabe von 10 Einheiten *DpnI*-Endonuklease zur Entfernung der methylierten parentalen-DNA inkubiert. 1 µL der unmethylierten Doppelstrang-DNA wurde in XL1-blue superkompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 50 mL LB-Medium mit 500 µL einer *E. coli* DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2- 0,5 kultiviert. Die für 10 min auf Eis gekühlte Bakterienkultur wurde für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet anschließend in 5 mL eiskaltem TSS-Puffer (10 % PEG 8000, 5 % DMSO, 30 mM MgCl₂, 1x LB) re-suspendiert. Die Bakterien wurden in 100 µL Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Die Einführung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien erfolgte nach der Hitzeschock-Methode (Cohen et al., 1972). Dazu wurden 100 µL kompetente *E. coli* DH5α-Bakterienzellen bzw. 50 µL superkompetente XL1-blue *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µL des Mutageneseproduktes für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C bei den

DH5 α -Zellen für 30 sec und bei den XL1-blue-Zellen für 45 sec. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 1 mL bzw. 500 μ L auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 250 μ L der Zellsuspension wurden im Anschluss auf eine mit Selektionsmarker versetzte LB-Agar-Platte aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Analytische Präparation von Plasmid-DNA

5 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 2 mL der Übernachtskultur wurden bei 13.000 rpm für 5 min pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben aus dem Bakterienzentrifugat mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kits isoliert und zur Sequenzierung verwendet.

Präparation von Plasmid-DNA für präparative Zwecke

Für präparative Ansätze wurden 150 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer Bakterienkolonie oder mit 1 mL einer 2 mL Übertagkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 6000 g für 15 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienzentrifugat mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Purification Kit oder des QIAGEN Plasmid Plus Purification Kits isoliert. Nach Elution der Plasmid-DNA mit Wasser wurde die Konzentration bestimmt und die DNA falls nötig auf 1 μ g/ μ L verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.5 Sequenzierung

Zur Bestätigung der Einführung von Punktmutationen wurden alle Proben sequenziert. Dazu wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers gemischt und mit Wasser auf 7 μ L aufgefüllt. Die Proben wurden zur Sequenzierung an Seqlab Sequence Laboratories (Göttingen) geschickt.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch mit Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Eine OD_{260} entspricht dabei 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Konzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch Messung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm und Bildung des Quotienten A_{260}/A_{280} lassen sich Verunreinigungen bestimmen. Bei nicht kontaminierten DNA-Proben hat dieser Quotient einen Wert von 1,8.

2.2.2.7 Herstellung von Zellextrakten

Für Western-Blot-Analysen, EMSA-Experimente, Immunpräzipitationsexperimente, *In-vitro*-Phosphorylierungs- und *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche wurden Gesamtzellextrakte benötigt. Dafür wurden die zuvor behandelten Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit eiskaltem cytosolischen Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4) für 5 min auf Eis lysiert. Dem Puffer wurden unmittelbar vor der Extraktion 0,1 % IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugegeben. Die benötigte Puffermenge richtete sich dabei nach der Größe der Zellkulturschale. Für eine 100-mm-Schale wurden in der Regel 500 μL Extraktionspuffer und pro Loch einer 6-Loch-Platte 35 μL Puffer verwendet.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden für 15 sec bei 13.000 rpm und 4 °C zur Sedimentierung der Zellkerne zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die cytosolischen Extrakte wurden entweder mit der gleichen Menge an nukleären Extrakten gemischt oder, falls sie nicht direkt verwendet wurden, für weitere Versuche bei -80 °C eingefroren.

Die pelletierten Zellkerne wurden in der dem cytosolischen Extraktionspuffer entsprechenden Menge an nukleärem Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 420 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dem nukleären Extraktionspuffer wurden unmittelbar vor Gebrauch 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugesetzt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurden die nukleären Extrakte entweder mit der gleichen Menge an cytosolischen Extrakten gemischt oder, falls sie nicht direkt verwendet wurden, für weitere Versuche bei -80 °C gelagert. Für Western-Blot-Versuche wurden die Extrakte mit 6x SDS-Probenpuffer (350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8 % SDS, 30 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol, 0,04 % Bromphenolblau) gemischt, für 3 min bei 95°C denaturiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurden STAT-Proteine gemäß ihrer Größe in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für Immunoblotting-Experimente verwandt. Für die SDS-PAGE kam das vertikale Gelelektrophoresesystem Minigel-Twin (Biometra, Göttingen) zum Einsatz. SDS-PAGE-Trenngele wurden mit 10 % (v/v) Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung) und 0,03 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,16 % TEMED in 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8) angesetzt. Das Sammelgel bestand aus 5 % Rotiphorese® Gel 30, 0,06 % APS, 0,2 % TEMED in 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8).

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten und bei -20 °C gelagerten Proteinproben wurden unmittelbar vor dem Auftragen erneut für 3 min bei 95 °C erhitzt und danach 10-18 μL in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 11 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,6) durchgeführt.

2.2.2.9 Western-Blot und immunchemische Proteindetektion

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für einen immunologischen Nachweis auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Der Elektrottransfer erfolgte nach der Semidry-Methode für 90 min bei 80 mA pro Gel in der PerfectBlue™ Semi-Dry Sedec™ M Blotapparatur (Peqlab). Zuvor wurde die Membran 5 min in Methanol hydrophilisiert und anschließend für mind. 30 min mit Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,0) gewaschen. Nach dem Transfer wurden die freien Bindestellen der Membran durch einstündige Inkubation unter Schütteln mit 1x Roti®-Block abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte unter Schütteln bei 4 °C über Nacht.

Nach fünfmaligem Waschen für je 5 min mit PBS-T-Puffer (1,5 M NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂HPO₄, 30 mM KCl, pH 7,4 mit 0,1 % Tween-20) wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert und im Anschluss erneut fünfmalig für jeweils 5 min mit PBS-T und einmal mit H₂O gewaschen. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte mit dem Western Lightning™ Chemiluminescence Reaction Plus Kit (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Autoradiographiefilme (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) auf den Membranen exponiert und mit Hilfe des Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

Um die an die Membran gebundenen Proteine erneut mit einem weiteren Antikörper analysieren zu können, wurde die Membran für 60 min bei 60 °C in Ablösepuffer (2 % SDS, 0,7 % β-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) inkubiert und die gebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran viermal für 15 min mit PBS-T gewaschen und danach erneut mit Roti®-Block und den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

2.2.2.10 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden Zellen auf 8-Kammer LabTek-Chamber-Slides kultiviert und mit dem Vektor pEGFP-N1-STAT1 bzw. einem seiner Derivate transfiziert. Zellen, die GFP-markiertes STAT1 exprimierten, wurden 16-24 h

nach Transfektion, wie jeweils angegeben, stimuliert und im Anschluss mit 4 % Roti-Histofix für 15 min bei RT fixiert. Es folgten zwei Waschschr tte mit PBS und einer mit dest. H₂O, bevor die Kerne mit Hoechst 33258 (5 µg/mL in PBS, Sigma-Aldrich GmbH) für 10 min bei RT unter Schütteln gefärbt wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS und H₂O wurden die Zellen mit Fluoromount-G-Eindeckmedium (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckt.

Für die immunzytochemische Detektion von unmarkierten STAT1-Proteinen wurden die Zellen zunächst für 10 min bei -20 °C mit Methanol fixiert, bevor sie für 20 min mit 1 % Triton-X 100 in PBS permeabilisiert wurden. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte eine 45-minütliche Behandlung der Zellen mit 25 % FBS in PBS. Danach erfolgte eine 45-minütliche Inkubation bei RT unter Schütteln mit dem Erstantikörper (1:1000 in 25 % FBS in PBS), anschließend wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter 45-minütlicher Inkubation bei RT mit Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege in 500-facher Verdünnung (25% FBS in PBS) unter Schütteln wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen, die Kerne mit Hoechst 33258 gefärbt und anschließend mit Fluoromount-G-Eindeckmedium eingedeckt.

Die immunzytochemisch angefärbten Zellpr parate bzw. GFP-Fusionsproteine exprimierende Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch mit dem Mikroskop DM5000B (Leica, Wetzlar) analysiert. Mit einer CCD-Kamera wurden von den Proben fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und mittels der QWin-Software (Leica) bearbeitet. GFP-gekoppelte Fusionsproteine wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm, Cy3-gekoppelte Antikörper bei 550 nm und Hoechst-gefärbte Zellkerne bei 280 nm aufgenommen. Die weitere Bearbeitung der digital gespeicherten Daten erfolgte mit dem Grafikprogramm CorelDraw (Corel).

2.2.2.11 Reporter-gen-Assay

Zur Analyse der Promotoraktivitäten von STAT1-WT und STAT1-Mutanten wurden unter anderem Luciferase-Reporter-gen-Assays mit unterschiedlichen Expressionsvektoren durchgeführt. Dazu wurde zum einen ein Luciferase-kodierendes Reporter-genkonstrukt des Ly6E-Gens eingesetzt, welches in seinem Promotor drei IFN -sensitive GAS-Bindestellen besitzt (Wen et al., 1995). Zum anderen kamen

Luciferase-kodierende Reportergenkonstrukte (pIC-339 und pIC-1352) des ICAM-1-Gens, welche nur eine GAS-Bindestelle besitzen, zum Einsatz. Zur Normierung wurde zusätzlich ein konstitutiv exprimierter β -Galactosidase-Reporter kotransfiziert und die β -Galactosidaseaktivität aus den gleichen Extrakten bestimmt.

U3R-Zellen wurden in 48-Loch-Kulturschalen kultiviert und pro Loch mit je 250 ng des STAT1-Expressionsplasmides, 200 ng des β -Galactosidase-Reportergens und 70 ng des 3xLy6E-Plasmids, des pIC-339-Plasmids oder des pIC-1352-Plasmids transfiziert. 16-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit IFN γ stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte für 15 min bei RT mit 100 μ L Triton-Glycylglycin-Lysepuffer (25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 1 % Triton X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA) pro Loch. Unmittelbar vor der Lyse wurden dem Puffer noch 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugegeben. Im Anschluss wurden die Lysate in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 20 μ L der Überstände wurden in eine weiße 96-Loch Immuno-Platte (NuncTM, Roskilde,DK) pipettiert und die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von 50 μ L Substratlösung des Luciferase-Assay-Systems (Promega, Mannheim) mit Hilfe des Luminometers Centro-LB-960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen.

Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wurden 20 μ L Lysat mit 280 μ L einer Substratlösung, bestehend aus 211 μ L Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 7,2), 66 μ L o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG, 4 mg/mL in 100 mM Natriumphosphat-Puffer) und 3 μ L einer 100x Magnesium-Lösung (100 mM MgCl $_2$, 4,5 mM β -Mercaptoethanol), versetzt. Die enzymatische Farbreaktion wurde nach ca. 20 min mit 500 μ L einer 0,5 M Na $_2$ CO $_3$ -Lösung gestoppt und die β -Galactosidaseaktivität photometrisch bei 420 nm mit dem Nicolet-Evolution-100-Photometer (Thermo, Dreieich) bestimmt. Es wurden jeweils sechs Messungen pro STAT1-Konstrukt durchgeführt und zur Normierung wurde der Quotient aus Luciferase-Aktivität und β -Galactosidaseexpression gebildet.

2.2.2.12 Dephosphorylierungs-Assay

Für die *In-vitro*-Dephosphorylierung wurden 10 µL Gesamtzellextrakt mit 10 µL Dephosphorylierungspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mg/mL BSA, 50 mM KCl, 5 mM EDTA) gemischt. Unmittelbar vor Pufferzugabe wurde dieser zusätzlich noch mit 20 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und zwei Einheiten T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP) (Biomol International, Plymouth, USA) versetzt. Die Proben wurden unterschiedlich lange bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer und Inkubation für 3 min bei 95 °C wurde die Reaktion gestoppt. Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot und immunchemischer Proteindetektion wurden die Proben analysiert.

Für die *In-vivo*-Dephosphorylierung wurden HeLa-S3- oder U3R-Zellen in 6-Loch-Platten mit STAT1-kodierenden Plasmiden transfiziert und 16-24 h danach mit IFN γ stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für unterschiedlich lange Zeiträume mit Staurosporin inkubiert. Nach Herstellung von cytosolischen und nukleären bzw. Gesamtzellextrakten wurde das Ausmaß der Dephosphorylierung mittels Western-Blot analysiert.

2.2.2.13 *In-vitro*-Phosphorylierungs-Assay

Für die *In-vitro*-Phosphorylierung wurden 10 µL Gesamtzellextrakt mit 10 µL Kinase-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,4, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na₃VO₄, 0,1 mM ATP) gemischt. Unmittelbar vor dem Versuch wurden dem Kinase-Puffer 10 mM DTT und 4 µg/mL Janus-Kinase 2 (Jak2) bzw. 2 µg/mL Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) zugegeben. Die Proben wurden für unterschiedliche Zeiträume bei 30 °C inkubiert und danach mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Analyse erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot mit immunchemischer Proteindetektion.

2.2.2.14 Gelretardationsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Mittels EMSA können Protein-DNA-Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Hierzu wurden radioaktiv markierte Sonden, die hochaffine STAT1-Bindestellen besitzen, mit Gesamtzellextrakten aus IFN γ -stimulierten, transient mit den entsprechenden STAT1-Derivaten transfizierten U3R-Zellen, inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund ihrer geringeren Mobilität von ungebundener DNA abgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Hybridisierungsreaktion

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Sonden für EMSA-Versuche benutzt. Dazu wurden die Überhänge komplementärer Oligonukleotide mit singulärer (M67), zweifacher (2xGAS), einer singulären gefolgt von einer degenerierten GAS-Bindestelle (GAS-nonGAS) oder zwei aufeinander folgenden degenerierten GAS-Bindestellen (2xnonGAS) radioaktiv markiert. Zur Herstellung der Sonden wurden je 50 pmol/mL komplementäre Oligonukleotide durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C in Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) und anschließender langsamer Abkühlung auf RT hybridisiert. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert.

Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA

Die radioaktive Markierung erfolgte durch Auffüllen der nicht komplementären 5'-überhängenden Enden des hybridisierten Oligonukleotides mit radioaktiven Nukleotiden. Dazu wurden 5 Einheiten des Klenow-Fragments der *E.coli* DNA-Polymerase I, das über 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität, nicht aber über 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt, in 5 μ L 10x Eco-Pol-Puffer (New England Biolabs) mit 0,1 ng doppelsträngigen Oligonukleotiden und je 8 μ L der vier [³²P]-markierten Desoxynukleotiden (dNTP) gemischt und für 25 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Überschuss von nicht-radioaktiven dNTPs (6,5 mM je dNTP) für weitere 5 min zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 1 μ L 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt. Freie Nukleotide wurden durch 3-minütige Zentrifugation bei 700 g und RT mit Hilfe von Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare) abgetrennt.

Gelretardation

Für die Bindungsreaktion wurden 0,2 µL radioaktiv-markierte DNA-Sonde, 1 µL PolydIdC (2 mg/mL), 1,3 µL DTT (100 mM), 3,5 µL H₂O in 2,5 µL 5x Gelshift-Puffer (100 mM Hepes, pH 7,9, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 % Ficoll), mit 4,5 µL Zellextrakt für 15 min bei RT inkubiert. Bei geringeren Extraktmengen wurden die Proben mit 1x PBS oder Zellextrakten von untransfizierten U3R-Zellen auf ein Gesamtvolumen von 13 µL aufgefüllt. Um zu zeigen, dass es sich bei dem resultierenden Signal um den STAT1-DNA-Komplex handelt, wurde ein Reaktionsansatz mit 1,3 µL des polyklonalen STAT1-Antikörpers C-24 (Santa Cruz) versetzt. Bei Verwendung von unmarkierten Oligonukleotiden als Kompetitor wurde 2 µl M67-Oligonukleotid (750-facher Überschuss) zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

Unmittelbar nach der Reaktion wurden die gebildeten Protein-DNA-Komplexe in einem nativem, präequilibriertem 4,8 %-igen TBE-Polyacrylamidgel bei 400 V und 4 °C mit 0,25x TBE-Laufpuffer für etwa 2,5 h aufgetrennt. Zum Gießen von zwei Gelen wurden 12 ml Rotiphorese[®] Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)-Lösung) mit 2,4 ml 10x TBE und 84 ml H₂O gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 2 ml 10 % APS und 100 µl TEMED gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel bei 80 °C auf Whatman-Papier (Albet LabScience, Dassel) vakuumgetrocknet und mindestens über Nacht bei RT auf Phospho-Imager-Folie exponiert. Die Folien wurden mit Hilfe des Fuji-BAS-1000 (Fuji, Düsseldorf) eingescannt und mit den Softwareprogrammen Adobe Photoshop oder Corel Draw ausgewertet.

2.2.2.15 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wurden U3R-Zellen in 6-Loch-Multischalen kultiviert und mit den entsprechenden STAT1-Expressionsplasmiden im pcDNA3.1-Vektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht in einem 1 % FBS enthaltendem Medium kultiviert und am nächsten Tag entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN_γ bzw. IFN_α stimuliert. Die RNA-Isolation erfolgte nach Absaugen des Mediums mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits nach Herstellerangaben. Zur Elution der RNA wurde 50 µL RNase-freies-Wasser

verwendet und die erhaltene RNA entweder direkt für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80 °C gelagert.

2.2.2.16 cDNA-Synthese

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus RNA wurde die reverse Transkription mit Hilfe des Verso-cDNA-Kits durchgeführt. Pro 20 µL Ansatz wurden 8 µL RNA eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.17 Real-time-PCR

Zur Untersuchung der Genexpression der unterschiedlichen Punktmutanten im Vergleich zu STAT1-WT wurde eine *real-time*-RT-PCR durchgeführt. Diese erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Absolute™-Blue-QPCR-SYBR®-Green Mixes oder des iQ-SYBR-Green Supermixes. Für eine 25 µL Reaktion wurden 1 µL cDNA eingesetzt und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die komplementären Primer wurden von der Firma Tib MolBiol bezogen. Dazu wurden aus der Literatur bekannte Zielgene von STAT1 verwendet.

2.2.2.18 Immunpräzipitation

HeLa-S3-Zellen einer 10cm-Platte wurden mit STAT1-Flag-kodierenden und STAT1-GFP-kodierenden Plasmiden kotransfiziert. Nach 16-24 h wurden die Zellen für 45 min mit IFN γ stimuliert und danach für weitere 15 min mit 0,8 mM Vanadat und 0,2 mM H₂O₂ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min auf Eis in Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 % Glycerin, 50 mM NaF, 10 mM Glycerolphosphat, 0,1 mM Na₃VO₄, 400 mM NaCl) lysiert. Dem Puffer wurden unmittelbar vor der Extraktion 1 % IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugegeben. Zur Abtrennung von unlöslichem Material wurden die Proben für 5 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. 50 µL des Überstandes wurden abgenommen, mit 9 µL 6 x

SDS-Probenpuffer gemischt und für 3 min bei 95 °C denaturiert (Input). Der Rest des Überstandes wurde mit Puffer A auf 2 mL aufgefüllt und mit 20 µL M2-Affinitäts-Gel (Sigma-Aldrich GmbH) für 3 h bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Präzipitate wurden viermal mit Puffer A gewaschen, in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 3 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert.

2.2.3 Statistik

Genexpressionsanalysen wurden mindestens dreimal in unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Bei den Reporteragen-Assays erfolgte jeweils eine sechsfache Bestimmung, für *real-time*-PCR eine Doppelbestimmung. Von den Ergebnissen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen mit Hilfe von Microsoft Office Excel und SigmaStat ermittelt. Nach Prüfung auf Normalverteilung der unverbundenen Stichproben und Gleichheit der Varianzen schloss sich eine Berechnung der Signifikanz mit Hilfe des t-Tests bzw. des Mann-Whitney-Ranksummentestes an. In allen Tests wurde ein p-Wert < 0,05 als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von konservierten Aminosäureresten in der Linker-Domäne von STAT1

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Funktion der Linker-Domäne von STAT1 weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden Punktmutanten der Linker-Domäne generiert und phänotypisch charakterisiert, um einen besseren Einblick in die biologische Rolle dieser Domäne zu erhalten. Es wird vermutet, dass die Linker-Domäne an der DNA-Bindung beteiligt ist, da bisher charakterisierte Mutanten eine veränderte Dissoziationsrate von DNA und eine veränderte transkriptionelle Aktivität von STAT1-Homodimeren aufweisen (Yang et al., 1999; Yang et al., 2002).

3.2 Charakterisierung von STAT1-K525A

Mit Hilfe der Kristallstruktur (**Abb. 3.1**) und durch Sequenzvergleich aller humaner STAT-Proteine wurde in Position 525 in der Linker-Domäne von STAT1 ein hoch-konservierter Lysinrest identifiziert. Anhand des Sequenzvergleiches mit STAT92E aus *D. melanogaster* und des STAT-Proteins aus Dictyostelium erkennt man, dass dieser Lysinrest in allen bisher bekannten STAT-Proteinen konserviert ist (**Tab. 3.1**).

STAT1	517	D	Q	L	N	M	L	G	E	K	L	L	G	P	N
STAT2	515	D	Q	L	S	M	L	R	N	K	L	F	G	Q	N
STAT3	523	E	Q	L	T	T	L	A	E	K	L	L	G	P	G
STAT4	514	D	Q	L	H	M	L	A	E	K	L	T	V	Q	S
STAT5a	529	E	N	L	V	F	L	A	Q	K	L	F	N	N	S
STAT5b	529	E	N	L	V	F	L	A	Q	K	L	F	N	N	S
STAT6	472	E	H	F	L	F	L	A	Q	K	I	F	N	D	N
92E	540	D	N	L	D	F	L	Y	E	K	L	Q	R	E	E
Dicty	533	R	P	L	S	S	Y	D	L	K	Y	I	Q	T	H

Tab. 3.1: Sequenzhomologie von STAT1-K525A. Der Lysinrest in Position 525 von STAT1 ist in allen bisher bekannten STAT-Proteinen konserviert.

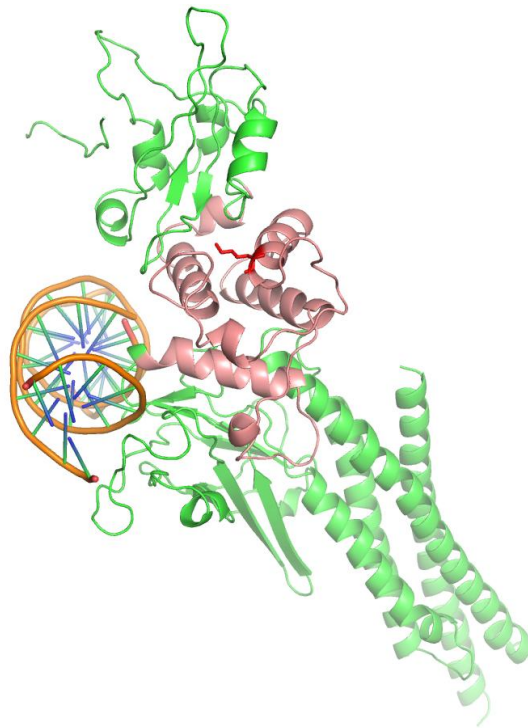


Abb. 3.1: Kristallstruktur von STAT1 mit K525. Das DNA-gebundene Monomer von STAT1 ist in grün dargestellt, die LD in lachs und der Lysinrest in Position 525 in rot.

3.2.1 Das Phosphorylierungsniveau von STAT1-K525A ist vermindert

Die Stimulation von Zellen mit Interferon führt zu einer Phosphorylierung von STAT1 am Tyrosinrest 701 und bewirkt eine Kernakkumulation von STAT1 (Darnell, 1997; Levy und Darnell, 2002). Um die Phosphorylierung und die damit verbundene Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-K525A zu überprüfen, wurden STAT1-GFP-kodierende Plasmide entsprechend mutiert und das rekombinante Protein nach Transfektion in humanen Zellen exprimiert. Mit Hilfe dieser Plasmide lässt sich die Phosphorylierung unter Verwendung eines Phospho-STAT1-spezifischen Antikörpers in Western-Blot-Experimenten direkt untersuchen. HeLa-S3-Zellen wurden transient mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-K525A-GFP transfiziert und für unterschiedliche Zeiten mit IFN γ stimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und durch Immunoblotting analysiert. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen an STAT1 in den Extrakten enthalten sind, wurde nach stringentem Abwaschen des Phospho-STAT1-Antikörpers die gleiche Western-Blot-Membran mit einem STAT1-Antikörper reinkubiert.

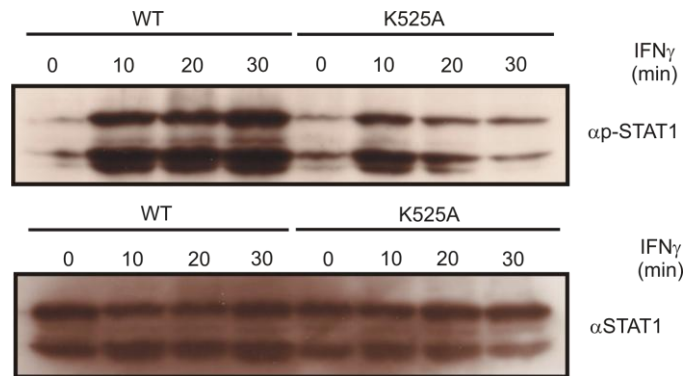


Abb. 3.2: Vermindertes Phosphorylierungsniveau von STAT1-K525A. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-K525A-GFP transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot. Die obere Reihe zeigt das Ergebnis eines Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit einem STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

STAT1-K525A zeigte bereits nach zehnminütiger Stimulation mit IFN γ ein vermindertes Phosphorylierungsniveau im Vergleich zu STAT1-WT. Auch nach 30 min IFN γ -Stimulation nahm die Phosphorylierung von STAT1-K525A nicht merklich zu (**Abb. 3.2**).

Mit Hilfe von STAT1-GFP-kodierenden Plasmiden kann man zusätzlich die Kinetik der Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation direkt fluoreszenzmikroskopisch untersuchen. Dazu wurden STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K525A-GFP- exprimierende HeLa-S3-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit IFN γ stimuliert, fixiert und nach Hoechst-Färbung der Kerne fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie man **Abb. 3.3** entnehmen kann, weisen STAT1-WT-GFP und STAT1-K525A-GFP im unstimulierten Zustand eine panzelluläre Verteilung auf. Die IFN γ -Stimulation führt zu einer Kernakkumulation von STAT1-WT. Nach 30 min Stimulation mit IFN γ ist STAT1-WT überwiegend im Zellkern lokalisiert, wohingegen STAT1-K525A immer noch eine vorwiegend panzelluläre Verteilung aufweist.

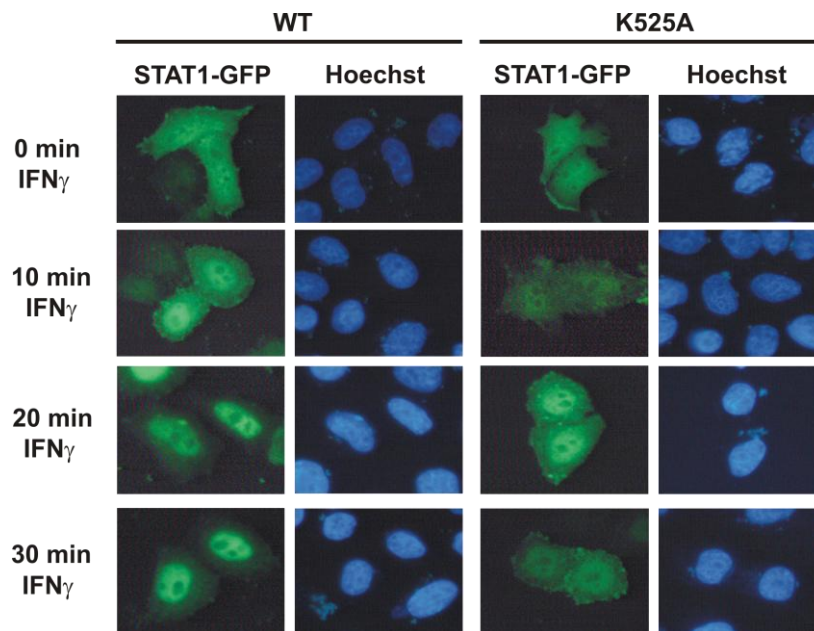


Abb. 3.3: STAT1-K525A besitzt eine verminderte Kinetik der Kernakkumulation. STAT1-WT-GFP bzw. STAT1-K525A-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und im Anschluss mit 4 % Formalin fixiert, bevor die Kerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt wurden.

Die verminderte Kinetik der Kernakkumulation kann auf einen defekten Import von STAT1-K525A hinweisen oder aber auf ein vermindertes Phosphorylierungsniveau. STAT-Proteine werden durch Rezeptor-assoziierte Kinasen phosphoryliert, hemmt man diese mit Staurosporin, ist eine Abnahme des Phosphorylierungsniveaus und ein damit verbundener vorzeitiger Zusammenbruch der Kernakkumulation zu beobachten. Um die Staurosporinsensitivität von STAT1-K525A zu überprüfen, wurden STAT1-WT-GFP und STAT1-K525A-GFP exprimierende Zellen für 45 min mit IFN γ stimuliert und im Anschluss für unterschiedliche Zeitpunkte mit Staurosporin behandelt. Nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation ist STAT1-WT komplett im Zellkern lokalisiert. Bei STAT1-K525A befindet sich noch ein geringer Teil des GFP-Fusionsproteins im Cytoplasma (**Abb. 3.4** 1. Reihe). Durch die Staurosporin-Behandlung und die dadurch verminderte Rephosphorylierungsrate wird Phospho-STAT1 bevorzugt dephosphoryliert und aus dem Zellkern hinaus transportiert. STAT1-K525A weist dabei eine erhöhte Staurosporinsensitivität im Gegensatz zu STAT1-WT auf. Nach einstündiger Behandlung mit Staurosporin ist STAT1-K525A wieder panzellulär verteilt, bei STAT1-WT ist dies erst nach drei Stunden der Staurosporin-Behandlung der Fall.

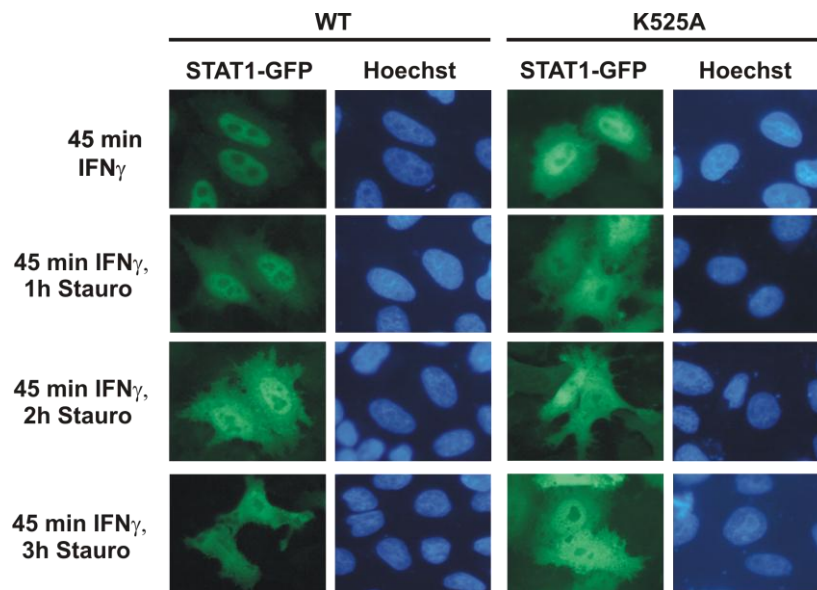


Abb. 3.4: Erhöhte Staurosporinsensitivität von STAT1-K525A. Transient mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP transfizierte HeLa-S3-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin behandelt. Danach wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt.

Ein anderer Nachweis für die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K525A erfolgte mittels Gelretardations-Assays (EMSA). Diese erlauben über den Nachweis einer spezifischen DNA-Bindung die indirekte und hochsensitive Bestimmung der Tyrosin-Phosphorylierung. Dazu wurden unterschiedliche [32 P]-markierte-DNA-Sonden eingesetzt: eine Sonde mit einer Einfach-GAS-Stelle (M67 oder GAS), eine Sonde mit einer GAS-Stelle gefolgt von einer nonGAS-Stelle (GAS-nonGAS), eine Sonde mit einer zweifachen GAS-Stelle (2xGAS) und einer zweifachen Nicht-GAS-Sonde (2xnonGAS). In allen EMSA-Experimenten wurden vergleichbare Extraktmengen aufgetragen. Mit Hilfe eines STAT1-spezifischen Antikörpers konnte man die erhaltene Bande als STAT1-DNA-Komplex (α S1) identifizieren, da die Zugabe des Antikörpers zu einer Veränderung im Laufverhalten und dadurch zu einer Verschiebung der Bande führt. Als Negativkontrolle wurde zu einer gleichen Lysatmenge ein STAT3-spezifischer Antikörper gegeben (α S3), bei dem diese Super-shiftreaktion, anders als bei der Zugabe von STAT1-spezifischem Antikörper, zu keiner Änderung im Laufverhalten der STAT1-DNA-Komplexe führte.

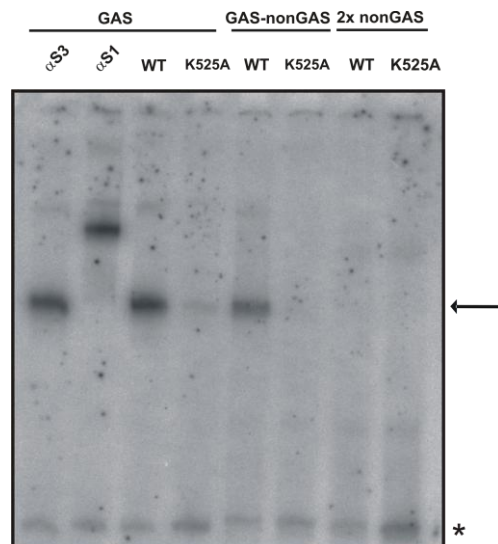


Abb. 3.5: Verminderte Affinität der DNA-Bindung von STAT1-K525A. Nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K525A-GFP-exprimierenden U3R-Zellen hergestellt und diese für 15 min mit den angegebenen Sonden inkubiert. Dabei handelt es sich um eine einfache GAS-Stelle (GAS), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle in Tandem-Anordnung (GAS-nonGAS) und einer zweifachen Nicht-GAS-Stelle (2xnonGAS). Die Proben wurden mit Hilfe eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper; α S3 bezeichnet einen Kontroll-Supershift mit STAT3-spezifischem-Antikörper. Der Pfeil markiert die Laufhöhe der STAT1-DNA-Komplexe. Der Stern markiert eine unspezifische Bande.

Für Gel-Shift-Assays wurden STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend Gesamtzellextrakte daraus gewonnen. Diese wurden für 15 min mit der jeweils angegebenen Sonde inkubiert und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgender Autoradiographie untersucht. Wie man in **Abb. 3.5** sieht, ist die DNA-Bindeaffinität von STAT1-K525A gegenüber STAT1-WT reduziert.

Zur Bestätigung der reduzierten DNA-Bindeaffinität wurde ein weiteres EMSA-Experiment durchgeführt. Dazu wurden STAT1-WT-GFP und STAT1-K525A-GFP exprimierende U3R-Zellen für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und im Anschluss für unterschiedliche Zeiten mit Staurosporin behandelt. Es wurden wieder Gesamtzellextrakte hergestellt und für 15 min mit M67-Sonde, die eine singuläre GAS-Bindestelle enthält, inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Analyse waren bei STAT1-K525A nach 15 min Staurosporininkubation im Vergleich zu STAT1-WT deutlich weniger mit DNA komplexierte STAT1-Komplexe nachweisbar (**Abb. 3.6**).

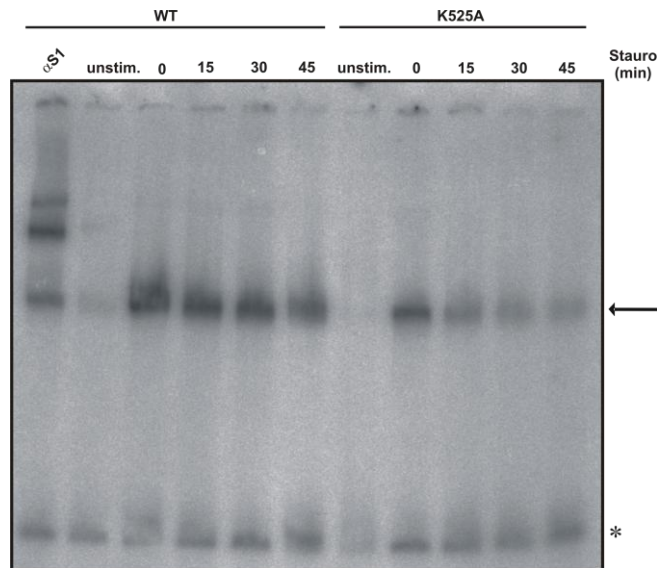


Abb. 3.6: Nachweis der verminderten GAS-Bindung von STAT1-K525A. STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin behandelt. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden für 15 min mit M67-Sonde inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. α S1 bezeichnet einen Supershift mit einem STAT1-spezifischem Antikörper. Der Pfeil markiert die STAT1-DNA-Komplexe; der Stern eine unspezifische Bande.

Um auszuschließen, dass die verminderte DNA-Bindung auf eine erhöhte Off-Rate von DNA zurückzuführen ist, wurde ein Kompetitions-Gel-Shift unter Zugabe von einem Überschuss an nicht-radioaktiv markierter M67-Sonde durchgeführt. Dazu wurden erneut Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierenden und mit IFN γ stimulierten U3R-Zellen für 15 min mit [32 P]-markierter M67-Sonde inkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 750-fachem Überschuss an unmarkierter M67-DNA behandelt. Zum Zwecke der Normalisierung wurde für STAT1-K525A aufgrund des verminderten Tyrosin-Phosphorylierungsniveaus eine doppelte so große Extraktmenge wie für STAT1-WT aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in gleicher Weise mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wiesen STAT1-WT und STAT1-K525A die gleiche Dissoziationskinetik auf (**Abb. 3.7**). Die verminderte DNA-Bindung beruht folglich nicht auf einer erhöhten Dissoziation von DNA, sondern kommt aufgrund einer verminderten Phosphorylierungsrate der Substitutionsmutante zustande.

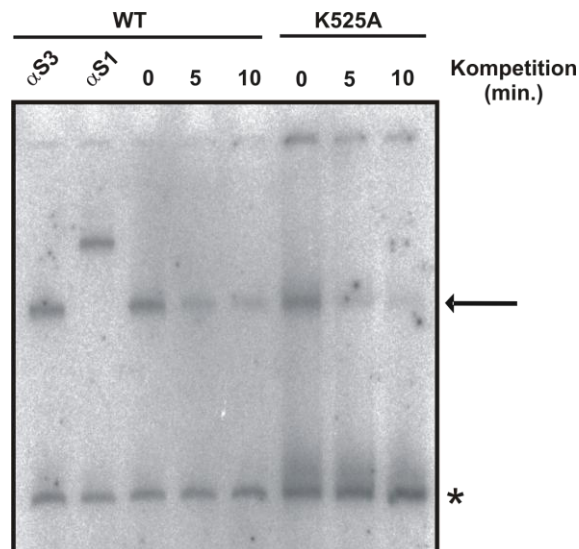


Abb. 3.7: STAT1-WT und STAT1-K525A besitzen eine ähnliche Dissoziationsrate von DNA. STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte gewonnen. Diese wurden für 15 min mit M67-Sonde inkubiert, bevor ein 750-facher Überschuss an unmarkierter M67-Sonde zugegeben wurde. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper, α S3 einen Kontroll-Supershift mit STAT3-spezifischem-Antikörper. Der Pfeil markiert die STAT1-DNA-Komplexe. Der Stern verweist auf eine unspezifische Bande.

In diesem Zusammenhang wurde auch überprüft, ob STAT1-K525A zur kooperativen DNA-Bindung fähig ist. Dazu wurden stimulierte U3R-Gesamtzellextrakte für 15 min mit der 2xGAS-Sonde inkubiert. Wie man in **Abb. 3.8** erkennt, binden beide Proteine sowohl in dimerer Form an eine singuläre GAS-Stelle wie auch in tetramerer Form an zwei Tandem-GAS-Stellen. Allerdings ist die DNA-Bindung von STAT1-K525A, anders als beim unmutierten Protein, an doppelten GAS-Bindestellen gegenüber der Bindung als Dimer nicht favorisiert. Nach Zugabe eines 750-fachen Überschusses an unmarkierter M67-Sonde bleibt der durch kooperative DNA-Bindung stabilisierte tetramere Komplex ebenso wie beim Wildtyp-Protein bestehen, während nicht-stabilisierte Dimere verschwinden. Dieses wird als Hinweis auf eine erhaltene Tetramer-Stabilisierung durch kooperative Effekte gewertet.

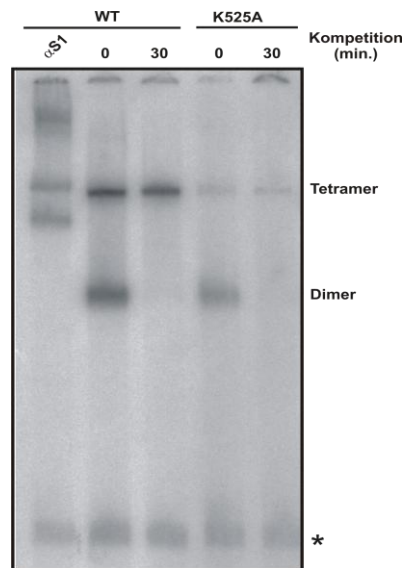


Abb. 3.8: STAT1-K525A ist zur kooperativen DNA-Bindung befähigt. STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert, anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt und für 15 min mit [32 P]-markierter 2xGAS-Sonde inkubiert. Nach der *In-vitro*-Inkubation wurde den Reaktionsansätzen ein 750-facher Überschuss an kalter M67-Sonde zugegeben und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben. In der ersten Bahn bezeichnet α S1 einen Supershift nach Zugabe eines STAT1-spezifischen Antikörpers. Bei der oberen Bande handelt es sich um DNA-stabilisierte, tetramere STAT1-Komplexe, bei der unteren um die STAT1-Dimere. Der Stern verweist auf eine unspezifische Bande.

3.2.2 STAT1-K525A besitzt eine inhibierte Genaktivierung aufgrund der verminderten Phosphorylierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit einer fehlenden Tyrosin-Phosphorylierung, etwa durch Mutation des essentiellen Tyrosinrestes in Position 701, ein vollständiger Verlust der transkriptionellen Aktivierbarkeit von IFN-abhängigen STAT1-Zielgenen einhergeht (Lim und Cao, 2006). Nach unserer Beobachtung eines geringeren Phosphorylierungsniveaus und einer kompromittierten DNA-Bindung stellt sich die Frage, wie sich diese Eigenschaften von STAT1-K525A auf deren Genaktivierung auswirken. Um dies zu überprüfen, wurden Reporter-gen-Assays durchgeführt. Dazu wurde zum einen ein synthetischer Luciferase-Promotor mit drei, in Tandem-Anordnung lokalisierten GAS-Bindestellen und zum anderen zwei native Promotoren für das humane Intrazelluläre-Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) verwendet, wobei die Letzteren jeweils nur eine singuläre, kanonische GAS-Stelle besitzen. pIC-339 ist ein

Luciferase-Reporter, welcher eine trunkierte Form des Promotors des ICAM-1-Gens enthält, pIC-1352 enthält den Volle-Länge-Promotor (Hou et al., 1994; Van de Stolpe et al., 1994).

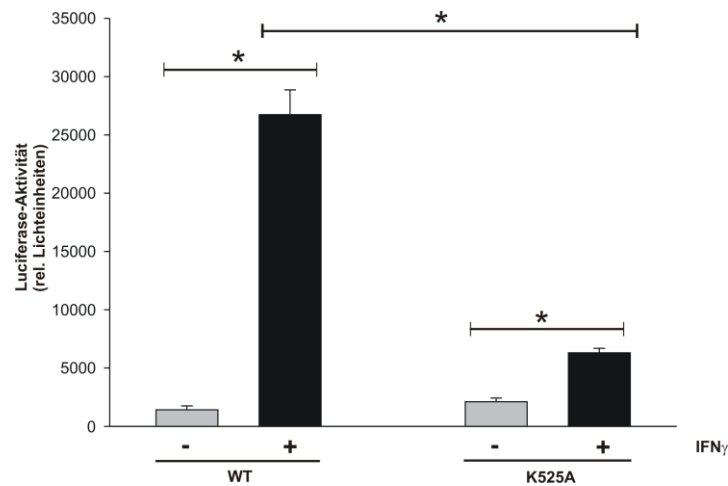


Abb. 3.9: Die IFN-abhängige Genaktivierung von STAT1-K525A ist durch die Mutation kompromittiert. U3R-Zellen wurden mit den Vektoren pSTAT1-WT und pSTAT1-K525A sowie den Reporter-gen-Konstrukten p3xLy6E und p β Gal transfiziert. 16-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (graue Balken) oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (schwarze Balken). Zellextrakte wurden hergestellt und die Luciferase-Aktivität in Proben von gleich großer Zellzahl bestimmt. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die spektrometrisch gemessene β -Galactosidase-Aktivität der jeweiligen Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Transient mit den pSTAT1-WT-, pSTAT1-K525A-Plasmiden, sowie den Plasmiden pGAS3xLy6E und p β Gal transfizierte U3R-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 6 h mit IFN γ stimuliert. Mit den Extrakten wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt und auf die β -Galactosidase-Aktivität normiert.

Wie man **Abb. 3.9** entnehmen kann, führt das verminderte Phosphorylierungsniveau zu einer signifikanten Abnahme der transkriptionellen Aktivität von STAT1-K525A ($p = 0,002$). Auch die Reporter-gen-Assays mit den nativen Promotoren bestätigen dieses Ergebnis. Die Genaktivierung von STAT1-K525A ist auch hier inhibiert (**Abb. 3.10**).

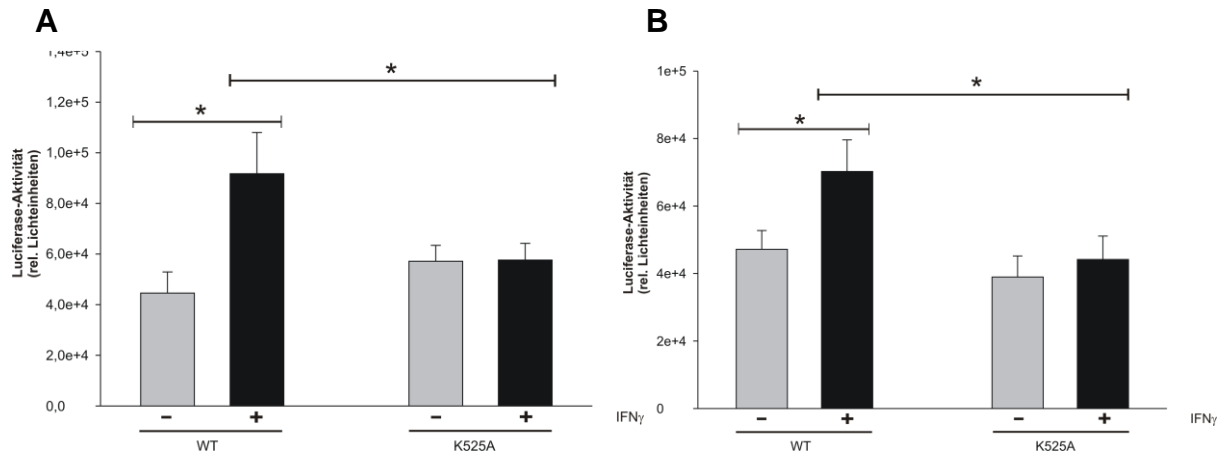


Abb. 3.10: Die Mutation K525A führt zum Verlust der Aktivierbarkeit von IFN γ -responsiven Reportergenem mit nativen Promotorelementen. U3R-Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten pIC-339 (A) bzw. pIC-1352 (B) und zusätzlich entweder mit pSTAT1-WT oder pSTAT1-K525A transfiziert. Zur Normierung wurde die Expression der kotransfizierten β -Galactosidase bestimmt. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (graue Balken) oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (schwarze Balken). Aus den Zellextrakten wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt und auf die β -Galactosidase-Aktivität der entsprechenden Probe bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der Genaktivierung von nativen Zielgenen *in vivo* wurden *real-time*-Experimente durchgeführt, bei denen die entsprechenden pcDNA3.1-Konstrukte zum Einsatz kamen, die cDNA-Sequenzen für die Expression von STAT1-K525A- bzw. -WT-Protein enthielten. Hierbei wurde die Genexpression von vier unterschiedlichen durch IFN γ induzierbaren, endogenen STAT1-Zielgenen analysiert und auf das jeweilige Expressionsniveau des Haushaltsgens *gapdh* normiert. Im Einzelnen wurden STAT1-negative U3R-Zellen mit den beiden pcDNA3.1-Konstrukten in getrennten Ansätzen transfiziert und 24 h danach das Vollmedium gegen 1 % FBS-haltiges Medium, ansonsten gleicher Zusammensetzung, ausgetauscht. Am nächsten Tag blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden wie üblich für 6 h mit IFN γ stimuliert. Als Positivkontrolle konnte anhand der *stat1*-mRNA sicher nachgewiesen werden, dass die STAT1-negativen Zellen infolge der Transfektion rekombinantes STAT1 exprimierten. Wie man in **Abb. 3.11 (A)** sehen kann, ist die Genaktivierung aller hier untersuchter nativer, IFN γ -responsiver Zielgene durch die Mutation K525A *in vivo* inhibiert. Die Zielgene *irf1* und *gfp1* wurden von den STAT1-K525A exprimierenden U3R-Zellen im Vergleich zu STAT1-WT signifikant geringer

aktiviert ($p = 0,029$). Eine *mig1*-Expression wurde anders als beim unmutierten Protein erst gar nicht beobachtet.

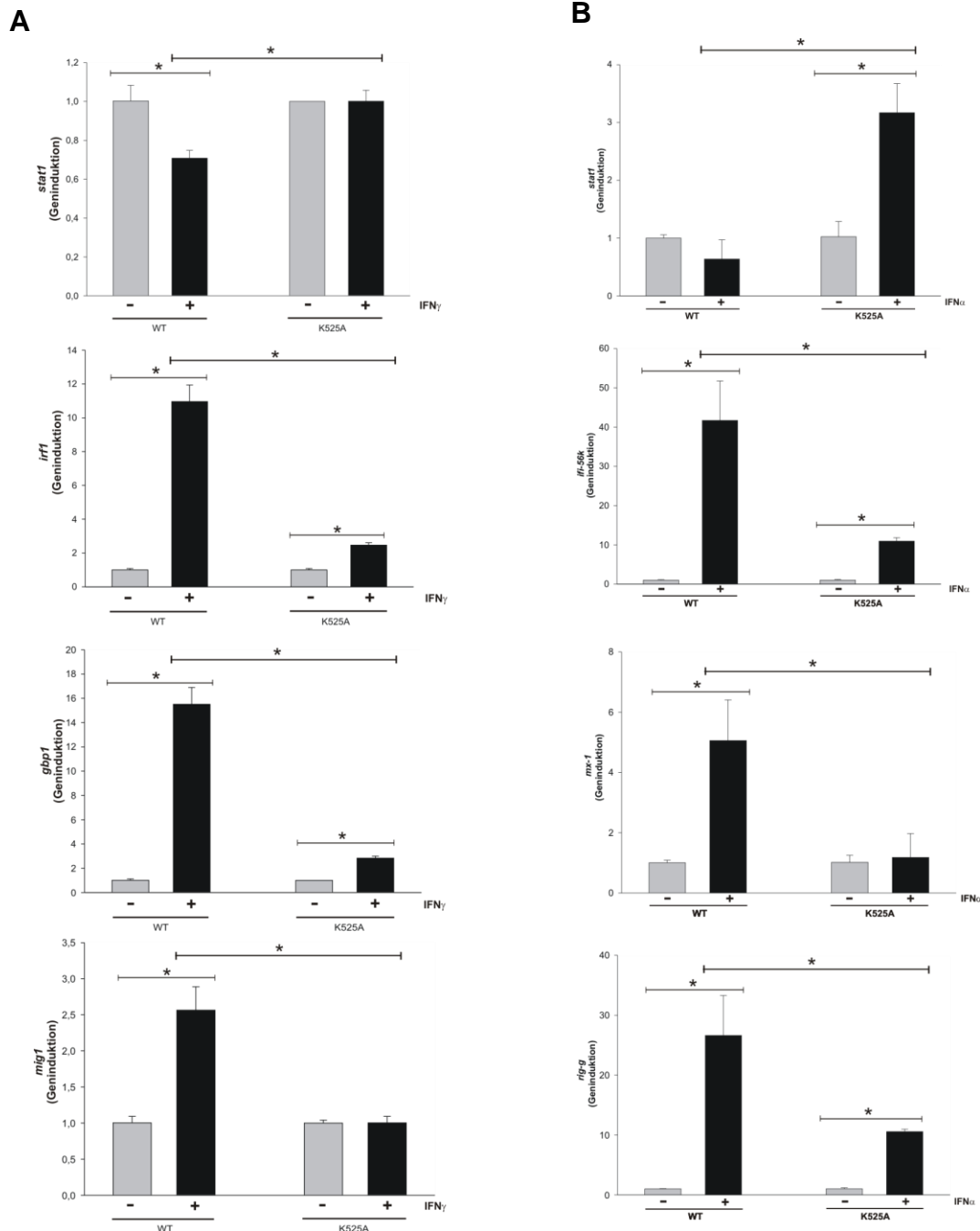


Abb. 3.11: STAT1-K525A besitzt *in vivo* eine reduzierte transkriptionelle Aktivität an nativen Zielgenen. 24 h nach der Transfektion wurde bei pSTAT1-WT- und pSTAT1-K525A-exprimierenden U3R-Zellen die FBS-Konzentration des Kulturmediums auf 1 % reduziert und die Zellen über Nacht im serumarmen Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen für weitere 6 h entweder unbehandelt belassen oder mit 5 ng/mL IFN γ (A) bzw. 5 ng/mL IFN α (B) stimuliert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die Expression der oben genannten Gene mittels *real-time*-PCR überprüft. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Werte der *gapdh*-Messung normiert. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Die Zielgenaktivierung nach Stimulation mit IFN α wurde ebenfalls *in vivo* überprüft (**Abb. 3.11 (B)**). Dabei wurde die Genaktivierung von drei verschiedenen endogenen IFN α -induzierbaren STAT1-Zielgenen untersucht. Zur Kontrolle der Transfektions-effizienz wurde die exprimierte mRNA-Menge von *stat1* mittels RT-PCR gemessen. Trotz der hohen Expressionsraten des mutierten Transkriptionsfaktors, die auch nach IFN γ -Stimulation beobachtet werden konnten, blieb die Zielgenaktivierung in den IFN α -stimulierten Proben von STAT1-K525A-exprimierenden Zellen signifikant inhibiert ($p \leq 0,001$). Dies bestätigt, dass durch die Substitution des Lysins in Position 525 die transkriptionelle Aktivität von STAT1 sowohl im IFN α - wie auch im IFN γ -Weg erheblich negativ beeinträchtigt ist.

3.2.3 Die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K525A betrifft alle untersuchten STAT1-vermittelten Zytokine

Die Freisetzung von Interferon und die damit verbundene Rezeptoraktivierung induziert unter physiologischen Bedingungen eine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 (Darnell, 1997). Für die bisherigen Experimente wurde STAT1-K525A durch Stimulation humaner Zellen mit IFN γ phosphoryliert. Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung vom verwendeten Zytokin abhängt, wurden *in vivo* Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Zytokinen durchgeführt. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP transfiziert und für die angegebenen Zeitpunkte entweder mit IFN α , IFN γ oder EGF stimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und diese mittels Western-Blot analysiert. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen an STAT1 in den Extrakten enthalten waren, wurde nach stringenter Abwaschen des Phospho-STAT1-Antikörpers die gleiche Western-Blot-Membran mit einem Pan-STAT1-Antikörper inkubiert.

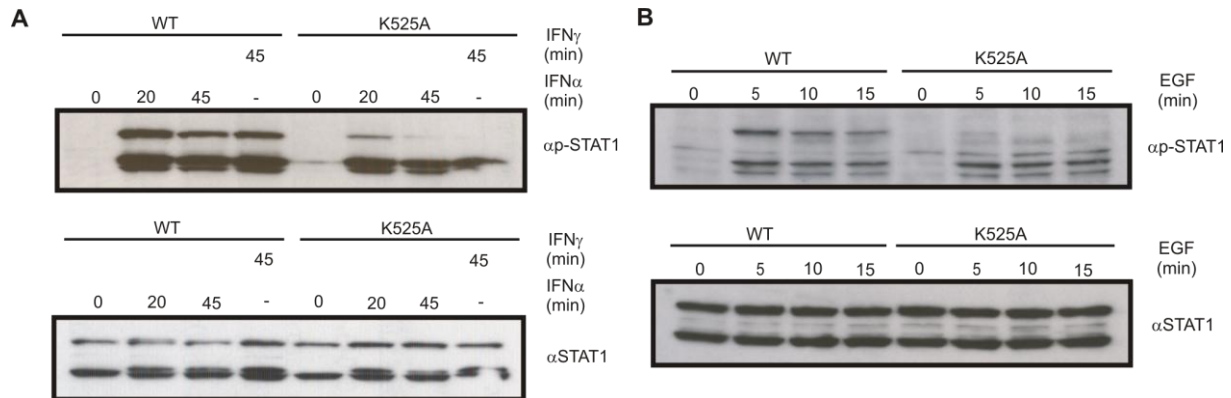


Abb. 3.12: Zytokin-unabhängiger Phosphorylierungsdefekt von STAT1-K525A. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP transfiziert. (A) Nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 5 ng/mL IFN α oder IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot. (B) Nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/mL EGF stimuliert und Gesamtzellextrakte mittels Western-Blot analysiert. Die obere Reihe zeigt jeweils das Ergebnis eines Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld sind die gleichen Blot-Membranen nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit einem STAT1-spezifischen Antikörper gezeigt.

Die Stimulation mit IFN α führt bei STAT1-WT zu einer deutlich detektierbaren Phospho-STAT1-Bande, bei STAT1-K525A ist nach 20 min jedoch nur eine schwache Phosphorylierungsbande detektierbar. Nach 45 min IFN α -Stimulation ist diese fast nicht mehr detektierbar (**Abb. 3.12 (A)**). Ein ähnliches Bild ist nach EGF-Stimulation beobachtbar. **Abb. 3.12 (B)** demonstriert, dass auch in EGF-stimulierten, STAT1-K525A-exprimierenden Zellen das Phosphorylierungssignal deutlich schwächer ausfällt als im Falle von unmutiertem STAT1. Der Reblot verweist auch hier auf eine gleiche Beladung der einzelnen Bahnen mit STAT1-enhaltenen Zell-extrakten.

Um zu untersuchen, an welchem Reaktionsschritt der JAK-STAT1-vermittelten Signalkaskade der vom mutierten Lysin 525 ausgehende Defekt ursächlich lokalisiert ist, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. Als erstes wurde überprüft, ob durch die Substitutionsmutation die Befähigung der Mutante, durch aktivierte Jak2-Kinase phosphoryliert zu werden, kompromittiert ist. Dazu wurden Zelllysate für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit Jak2 inkubiert und im Anschluss daran das Phosphorylierungsniveau mittels Western-Blot untersucht. Auch hier wurde mittels eines Pan-STAT1-spezifischen Antikörpers die aufgetragene STAT1-Menge kontrolliert.

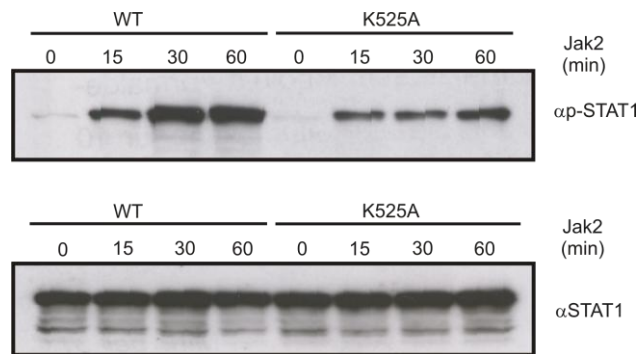


Abb. 3.13: *In-vitro*-Phosphorylierung mit Jak2. Nach der Transfektion von U3R-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP wurden die Zellen unbehandelt belassen und Gesamtzellextrakte gewonnen. Diese wurden für die angegebenen Zeitpunkte bei 30 °C mit 4 µg/mL Jak2 inkubiert und die Phosphorylierung mittels Western-Blot überprüft. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Wie man **Abb. 3.13** entnehmen kann, ist STAT1-K525A zwar prinzipiell ein Substrat für die Jak2-Kinase, das Phosphorylierungsniveau ist aber im Gegensatz zu STAT1-WT deutlich vermindert.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung des Phänotyps der untersuchten Mutante, ist die Überprüfung auf einen Rezeptorbindungsdefekt. Dazu wurde die Rezeptorbindung *in vitro* mittels eines aktiven Rezeptors untersucht. Verwendet wurde dafür der EGF-Rezeptor (EGFR), da dieser über intrinsische Kinaseaktivität verfügt. STAT1-WT- und STAT1-K525A-exprimierende U3R-Zellen wurden unbehandelt belassen und daraus Gesamtzellextrakte gewonnen. Diese wurden für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit dem isolierten EGF-Rezeptor inkubiert und die Phosphorylierung mittels Western-Blot untersucht. Wie man in **Abb. 3.14** erkennt, zeigt STAT1-K525A eine deutlich geringere Phosphorylierungsrate nach EGFR-Behandlung als die Proben des in gleicher Weise behandelten Wildtyp-Moleküls.

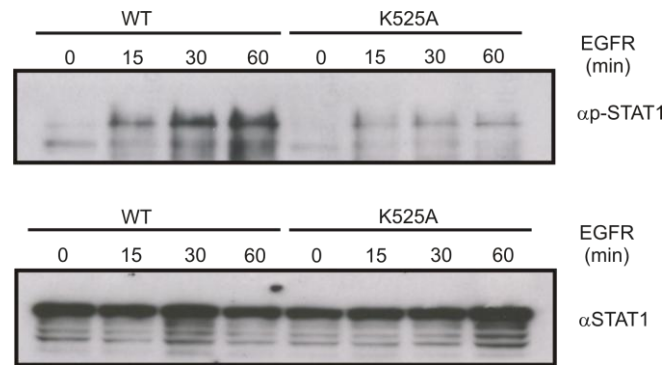


Abb. 3.14: Reduzierte Phosphorylierung *in vitro* von STAT1-K525A durch EGF-Rezeptor-Kinase. Von unstimulierten U3R-Zellen, die entweder STAT1-WT-GFP oder seine K525A-Mutante exprimierten, wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und diese für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit 2 µg/mL EGF-Rezeptor inkubiert. Die obere Reihe zeigt das Immunoblotting-Ergebnis mit einem Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und Re-Inkubation mit einem STAT1-spezifischen Antikörper gezeigt.

Anhand dieser Ergebnisse könnte es sich bei STAT1-K525A möglicherweise um eine Mutante mit defekter Rezeptorbindung oder Dimerisierung handeln. Um dieses näher zu analysieren, wurden weitere Versuche zur Überprüfung der Rezeptorbindung mittels Immunpräzipitation durchgeführt (**Abb. 3.15**). Aus der Literatur ist bekannt, dass STAT1-Mutanten, die nicht dimerisieren können, auch nicht an den Rezeptor binden, da beide Reaktionen durch die SH2-Domäne vermittelt werden. Aus diesem Grund wurde die Dimerisierung von STAT1-WT und STAT1-K525A im Vergleich zu einer dimerisierungsdefizienten Mutante untersucht (Shuai et al., 1993b und 1996; Chen et al., 1998). Dazu wurden Expressionsplasmide, die für STAT1-Addukte mit Flag- oder GFP-Markern kodieren, hergestellt und diese in HeLa-S3-Zellen kotransfiziert. Nach der Extraktion wurden Immunpräzipitationen mit einem Flag-spezifischen Antikörper durchgeführt und die erhaltenen Immunpräzipitate im Western-Blot nach Inkubation mit einem α-STAT1-Antikörper auf die Präsenz von GFP-markierten STAT1-Proteinen untersucht.

Bei STAT1-R602L, einer aus der Literatur bekannten dimerisierungsinkompetenten Mutante, konnte aufgrund des Dimerisierungsdefekts kein STAT1-GFP im Western-Blot nachgewiesen werden. STAT1-K525A hingegen zeigte die gleiche STAT1-GFP-Bande wie der WT. Das bedeutet, dass die Funktionalität der SH2-Domäne von STAT1-K525A nicht beeinträchtigt ist und dass die Mutante zu einer normalen

Dimerisierung befähigt ist. Mit Hilfe dieses Experiments konnte ein Rezeptor-bindungsdefekt von STAT1-K525A ausgeschlossen werden.

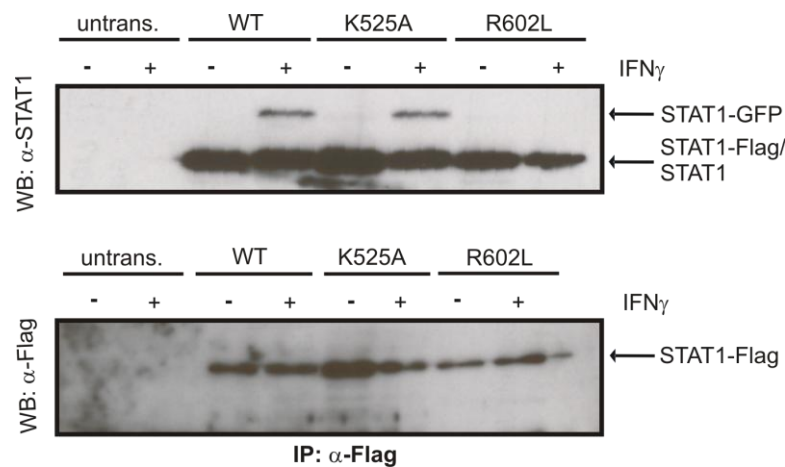


Abb. 3.15: STAT1-K525A besitzt die Fähigkeit zur Dimerisierung. HeLa-S3-Zellen wurden mit den jeweiligen GFP- und Flag-exprimierenden Plasmiden der angegebenen STAT1-Mutanten kotransfiziert. Danach wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 45 min mit IFN γ und anschließend für 15 min mit 0,8 mM Vanadat/ 0,2 mM H $_2$ O $_2$ stimuliert. Aus Zellextrakten wurden Immunpräzipitate mit einem Anti-Flag-Antikörper hergestellt und Aliquots davon entweder mit einem spezifischen Antikörpern gegen STAT1 (oben) oder Flag (unten) in Western-Blot-Technik markiert.

3.2.4 Das verminderte Phosphorylierungsniveau von STAT1-K525A lässt sich durch Vanadat-Zugabe kompensieren

Im nächsten Versuch wurde überprüft, ob sich die verminderte Tyrosin-Phosphorylierung durch Vanadat-Zugabe kompensieren lässt. Vanadat hemmt die für die Dephosphorylierung von STAT1 verantwortlichen Phosphatasen und lässt die Phospho-STAT1-Menge im Falle des STAT1-Wildtyp-Moleküls ansteigen. Durch die fehlende Inaktivierung lässt sich eine Vanadat-induzierte Hyperphosphorylierung detektieren (Haspel et al., 1996).

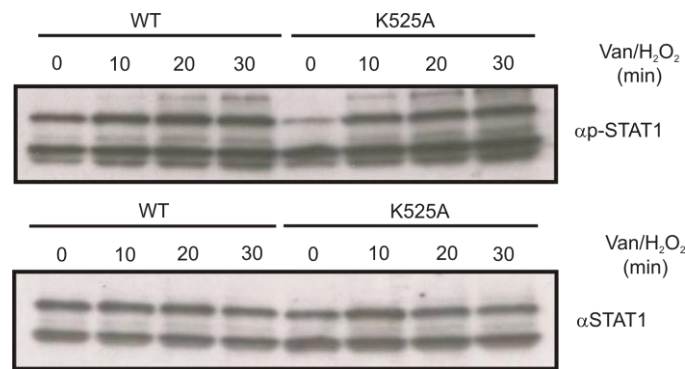


Abb. 3.16: Vanadat-Zugabe kompensiert die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K525A. STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 15 min mit 5 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und im Anschluss für die angegebenen Zeiten mit 0,8 mM Vanadat/ 0,2 mM H_2O_2 behandelt. Gesamtzellextrakte wurden gewonnen und die induzierte Hyperphosphorylierung mittels Western-Blot überprüft. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Transient mit den jeweiligen Plasmiden transfizierte HeLa-S3-Zellen wurden mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und im Anschluss für die angegebenen Zeitpunkte mit Vanadat/ H_2O_2 behandelt. Gesamtzellextrakte wurden gewonnen und mittels Western-Blot analysiert. In **Abb. 3.16** sieht man, dass STAT1-K525A zum Zeitpunkt 0 (15 min $\text{IFN}\gamma$, 0 min Vanadat/ H_2O_2), also bei Abwesenheit einer Vanadatinkubation, erneut geringer phosphoryliert ist als STAT1-WT. Durch Vanadat-Zugabe lässt sich die verminderte Phosphorylierung jedoch vollständig kompensieren, so dass man nach 10 min Vanadat-Behandlung ein vergleichbares Phosphorylierungsniveau von STAT1-WT und STAT1-K525A erhält.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Vanadat auf die gehemmte Kernakkumulation von STAT1-K525A untersucht. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit den Expressionsplasmiden pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP transfiziert und für 15 min mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Danach wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit Vanadat/ H_2O_2 behandelt, bevor sie mit 4 % Formalin fixiert und die Kerne mit Hoechst angefärbt wurden. Das Ausmaß der Kernakkumulation wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt.

Zum besseren Vergleich wurde bei diesem Versuch STAT1-DNA^{Minus} als Kontrolle mit untersucht. DNA^{Minus} weist auch nach Vanadat-Behandlung nur eine geringe Konzentration in den Nuklei auf (Meyer et al., 2003). Der Vergleich von STAT1-

K525A mit DNA^{Minus} und STAT1-WT zeigte aber deutlich, dass eine Vanadat-Behandlung die inhibierte Kernakkumulation von STAT1-K525A wiederherstellt (**Abb. 3.17**).

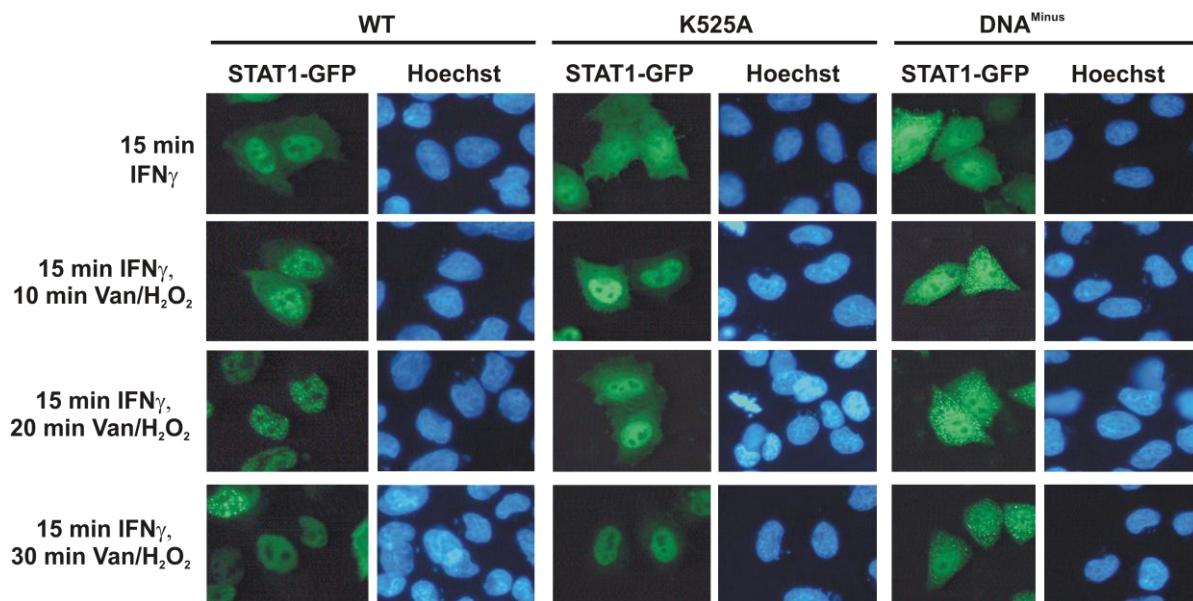


Abb. 3.17: Vanadat induziert ein normales Kernakkumulationsverhalten von STAT1-K525A. STAT1-WT-GFP-, STAT1-K525A-GFP- und STAT1-DNA^{Minus}-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für jeweils 15 min mit 5 ng/mL IFN_γ behandelt und danach für die angegebenen Zeiten mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit 4 % Formalin fixiert, die Zellkerne mittels Hoechst-Farbstoff gefärbt und die Kernakkumulation fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem K525A-Protein nicht um eine Mutante mit einem prinzipiellen Phosphorylierungsdefekt handelt, konnte in EMSA-Experimenten erbracht werden. STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden für 15 min mit IFN_γ stimuliert und danach für die angegebenen Zeitpunkte mit Vanadat/H₂O₂ behandelt. Gesamtzellextrakte aus diesen Zellen wurden für 15 min mit [³²P]-markierter M67-Sonde inkubiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung autoradiographisch untersucht. Das Ergebnis dieses Gelshiftexperimentes bestätigte, dass eine Vanadat-Behandlung die DNA-gebundene Menge von STAT1-K525A erhöht (**Abb. 3.18**).

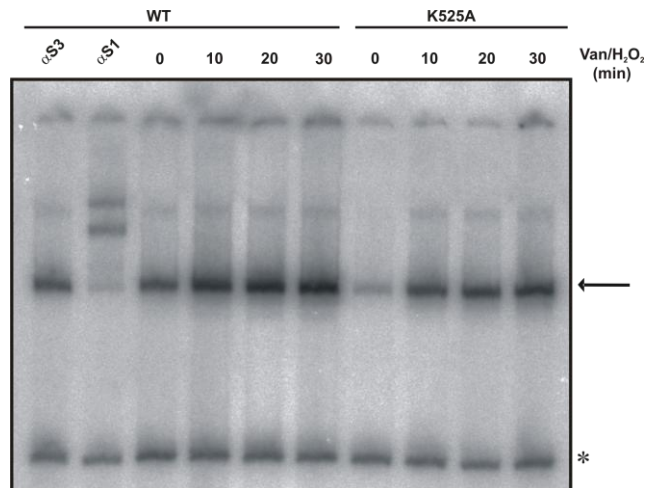


Abb. 3.18: Vanadat-Behandlung erhöht die Menge von DNA-gebundenem STAT1-K525A. STAT1-WT-GFP- und STAT1-K525A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden für 15 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und im Anschluss für die angegebenen Zeiten mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ behandelt. Gesamtzellextrakte dieser Zellen wurden für 15 min mit [32 P]-markierter M67-DNA inkubiert. Die Auftrennung erfolgte mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper; α S3 einen Kontroll-Supershift mit STAT3-spezifischem Antikörper. Der Pfeil markiert die STAT1-DNA-Komplexe. Der Stern markiert eine unspezifische Bande.

3.2.5 Experimente *in vivo* und *in vitro* beweisen, dass es sich bei STAT1-K525A um eine Dephosphorylierungsmutante handelt

Der bislang beschriebene Phänotyp von STAT1-K525A ergibt sich zweifelslos aus der verminderten Phosphorylierungsrate der Mutante. Überdies konnte gezeigt werden, dass bei STAT1-K525A unter Vanadatexposition Phosphatgruppen in den Tyrosinrest 701 inkorporiert werden. Es handelt sich also nicht um eine Mutante mit einem prinzipiellen Phosphorylierungsdefekt, denn die Vanadat-Zugabe führte zu einer uneingeschränkten Hyperphosphorylierung. Deshalb wurde zuletzt getestet, ob diese Mutante *in vivo* und *in vitro* einer verstärkten Dephosphorylierungsrate unterliegt.

Für die Untersuchung *in vivo* wurden HeLa-S3-Zellen transient mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP Expressionsplasmiden transfiziert und für 45 min mit IFN γ behandelt. Im Anschluss an die IFN γ -Stimulation wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit Staurosporin, einem Kinaseinhibitor inkubiert. Nach Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte sieht man in **Abb. 3.19 (A)**, dass das

Phosphorylierungssignal bei STAT1-K525A schneller abnimmt als beim WT-Protein. *In-vitro*-Dephosphorylierungsassays mit der aufgereinigten T-cell Protein Phosphatase (TC-PTP) bestätigten eindrucksvoll dieses Ergebnis. Dazu wurden Gesamtzellextrakte von IFN γ -stimulierten STAT1-WT- bzw. STAT1-K525A-exprimierenden U3R-Zellen *in vitro* für unterschiedliche Zeiten bei 30 °C mit TC-PTP inkubiert. Für STAT1-K525A wurde die doppelte Extraktmenge als beim WT eingesetzt, um eine Normierung auf gleiche Phospho-STAT1-Konzentrationen in den Reaktionsansätzen zu gewährleisten.

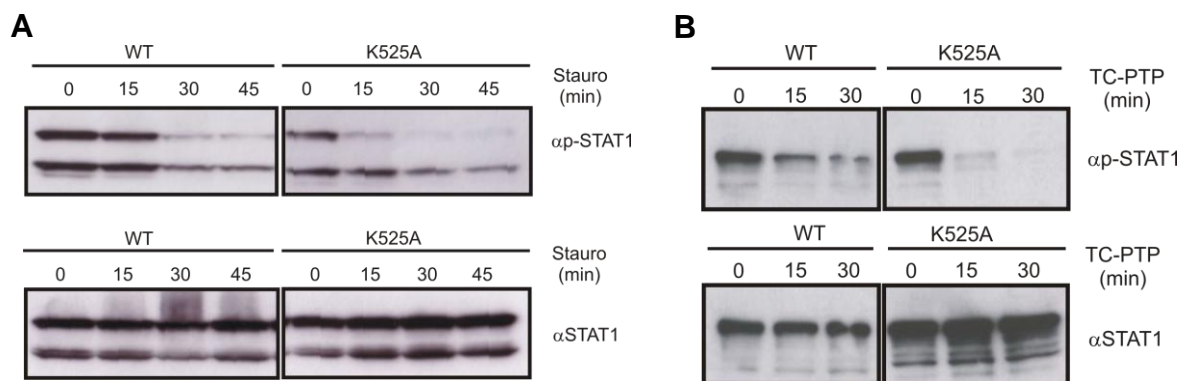


Abb. 3.19: *In-vivo*- und *In-vitro*-Dephosphorylierung von STAT1-K525A. (A) HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K525A-GFP transfiziert und für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Vor der Extraktion von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen noch für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin behandelt. Die Dephosphorylierungskinetik wurde mittels Western-Blot analysiert. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt. (B) STAT1-WT- und STAT1-K525A-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert, Gesamtzellextrakte gewonnen und für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit 2 U TC-PTP inkubiert. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Mittels dieser Western-Blot-Experimente konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei STAT1-K525A um eine Dephosphorylierungsmutante handelt (**Abb. 3.19**). Die Linker-Domäne ist also nicht nur, wie bekannt an der DNA-Bindung, sondern auch an der Rekrutierung der Phosphatase beteiligt.

3.3 Charakterisierung von STAT1-E500A

Mit Hilfe der Kristallstruktur (**Abb. 3.20**) konnte ein Glutamatrest an der Oberfläche von STAT1 identifiziert werden. Dieser Glutamatrest befindet sich in der Linker-Domäne und ist in der Familie der STAT-Proteine hoch konserviert (**Tab. 3.2**). Lediglich STAT2 besitzt an dieser Position einen Prolinrest. Der Glutamatrest in Position 500 von STAT1 wurde in dieser Arbeit nach Alanin mutiert und der Phänotyp dieser Mutante untersucht.

STAT1	493	A	R	W	A	Q	L	S	E	V	L	S	W	Q	F	S	S
STAT2	491	A	P	W	S	L	L	G	P	A	L	S	W	Q	F	S	S
STAT3	499	G	T	W	D	Q	V	A	E	V	L	S	W	Q	F	S	S
STAT4	490	A	T	L	S	Q	L	L	E	V	M	S	W	Q	F	S	S
STAT5a	503	V	L	W	P	Q	L	C	E	A	L	N	M	K	F	K	A
STAT5b	503	V	L	W	P	Q	L	C	E	A	L	N	M	K	F	K	A
STAT6	446	V	P	W	E	K	M	C	E	T	L	N	L	K	F	M	A

Tab. 3.2: Sequenzhomologie von STAT1-E500A. Der Glutamatrest in Position 500 ist bei allen Mitgliedern der STAT1-Familie konserviert. Lediglich STAT2 besitzt an dieser Position einen Prolinrest.

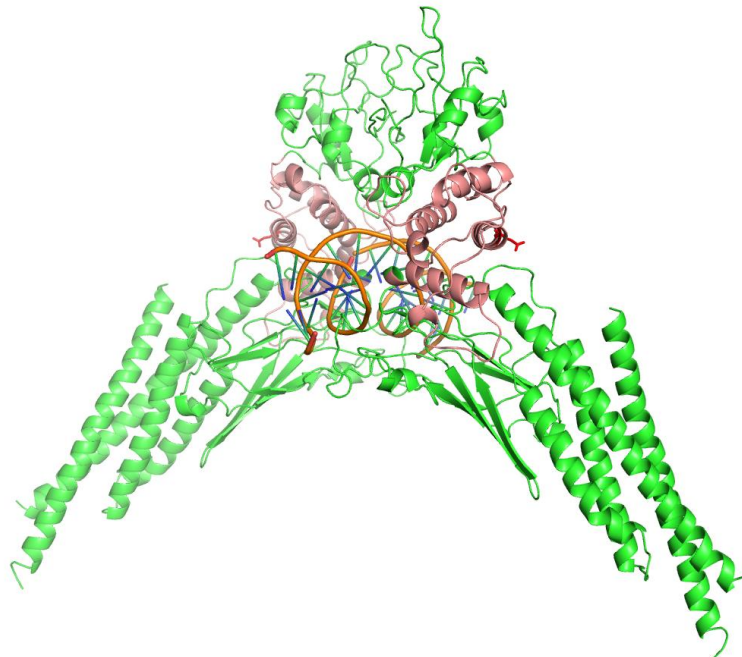
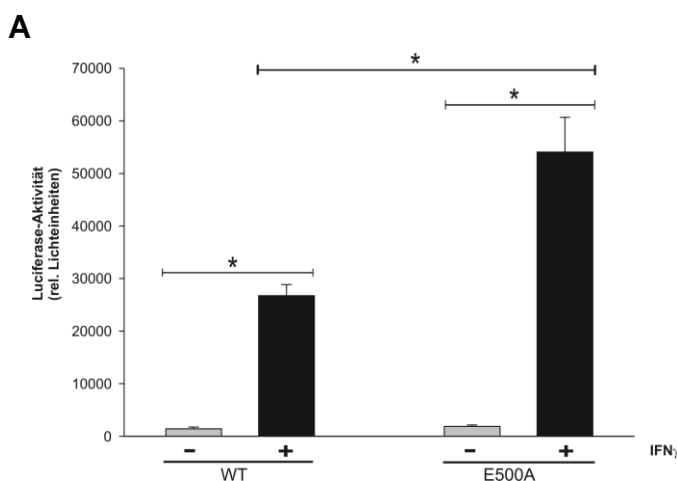


Abb. 3.20: Kristallstruktur von STAT1 mit Darstellung des Glutamatrestes in Position 500. Das DNA-gebundene Dimer ist in grün dargestellt, die LD in lachs und der Aminosäurerest E500 der jeweiligen Monomere in rot.

3.3.1 Die Einführung eines Alaninrests an Position 500 von STAT1 führt zu einer verbesserten transkriptionellen Aktivität nach IFN γ -Stimulation

Nach Zytokinstimulation und Aktivierung gelangen STAT-Moleküle als Dimere in den Zellkern, wo sie die Expressionsrate von Zielgenen modulieren. Die transkriptionelle Aktivität hängt dabei von der Phosphorylierung und der Affinität zur DNA ab (Yang et al., 2002; Meyer und Vinkemeier, 2004). Die Überprüfung der transkriptionellen Aktivität von STAT1-E500A fand in einem ersten Versuch unter Verwendung von Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten statt. Dazu wurde einmal ein Luciferase-Reporter benutzt, der durch einen synthetischen Promotor mit dreifacher GAS-Bindestelle im Abstand von 10 bp (3xLy6E) reguliert wird. Des Weiteren wurden Reporter-Gen-Assays unter Verwendung eines nativen Promotors durchgeführt. Ein Reporter-Gen (pIC-339) besteht aus einer trunkierten Form des Promotors für das humane Intrazelluläre-Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und besitzt eine kanonische GAS-Stelle. Ein anderes Konstrukt (pIC-1352) besitzt den Volle-Länge-Promotor des ICAM-1-Gens (Hou et al., 1994; Van de Stolpe et al., 1994). Für alle Versuche wurden U3R-Zellen mit den pcDNA3.1-Plasmiden pSTAT1-WT, pSTAT1-E500A, sowie mit den Reportern pGAS3xLy6E bzw. pIC-339 oder pIC-1352 und p β Gal transfiziert. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit IFN γ stimuliert. Mit Hilfe spektrometrischer Verfahren wurde die Luciferase-Aktivität der Zellextrakte bestimmt und die Normierung auf die β -Galactosidase-Aktivität durchgeführt.



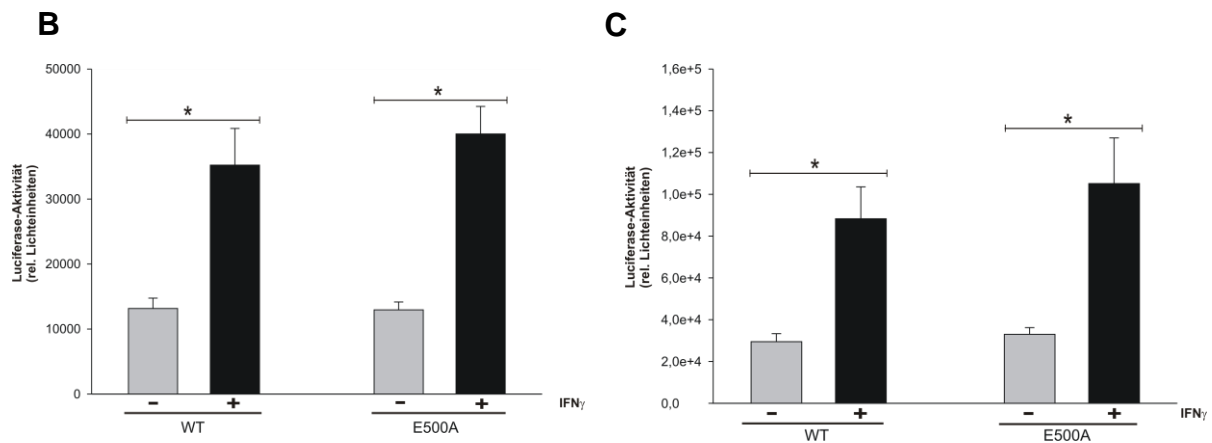


Abb. 3.21: Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A ist im Reporter-gen-Assay differentiell reguliert. U3R-Zellen wurden mit pSTAT1-WT bzw. pSTAT1-E500A sowie mit den Reportern pGAS3xLy6E (A) bzw. pC-339 (B) oder pC-1352 (C) und p β Gal transfiziert und 16 -24 h danach unbehandelt belassen oder in parallelen Ansätzen für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Zell-extrakte wurden hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Normiert wurde auf die β -Galactosidase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Wie man in **Abb. 3.21** sieht, ist die Expression des Luciferase-Gens für STAT1-E500A bei allen drei Reporter-gen-Konstrukten im Vergleich zu STAT1-WT erhöht; im Falle des 3xLy6E-Promotors ist diese Erhöhung signifikant ($p \leq 0,001$).

Um zu überprüfen, ob die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A auch bei anderen als der verwendeten Konzentration an IFN γ beobachtet wird, wurden STAT1-WT- und STAT1-E500A-exprimierende U3R-Zellen mit unterschiedlichen IFN γ -Konzentrationen stimuliert und die Luciferase-Gen-Expression mit Hilfe des 3xLy6E-Promotors überprüft. Bei alle untersuchten Interferon-Konzentrationen war die Expression des Luciferase-Gens durch den STAT1-E500A-Transkriptionsfaktor im Vergleich zum Wildtyp-Molekül erhöht (**Abb. 3.22**). Der verbesserte transkriptionelle Effekt der Punktmutante an einer artifiziiellen, starken Promotorregion wird also über einem breiten Spektrum der Zytokin-Konzentration beobachtet.

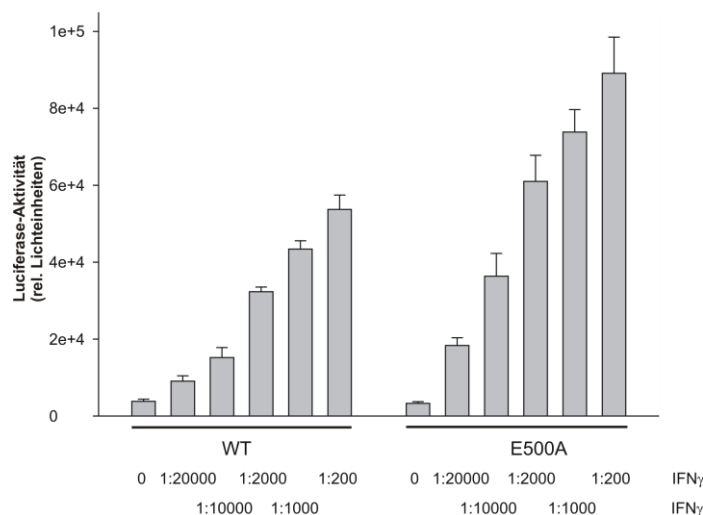


Abb. 3.22: Die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A im Reporter-Gen-Assay ist unabhängig von der IFN γ -Konzentration. U3R-Zellen wurden mit pSTAT1-WT bzw. pSTAT1-E500A sowie mit pGAS3xLy6E und p β Gal transfiziert und 16-24 h danach entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit unterschiedlichen IFN γ -Konzentrationen stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luciferase-Aktivität in jeweils sechs unabhängigen Proben für jede gewählte Konzentration gemessen. Normiert wurde auf die β -Galactosidase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen.

Zusätzlich zu den *In-vitro*-Versuchen wurde die Genaktivierung von STAT1-E500A *in vivo* überprüft. Dies wurde mittels *real-time*-PCR unter Verwendung der jeweiligen pcDNA3.1-Konstrukte durchgeführt. Hierbei wurde die Genexpression von vier unterschiedlichen endogenen, IFN γ -induzierbaren STAT1-Zielgenen untersucht und auf die jeweiligen *gapdh*-Werte normiert. Dazu wurden U3R-Zellen mit den pcDNA3.1-Konstrukten transfiziert und 24 h danach das Vollmedium gegen ein 1 % FBS-haltiges Medium ausgetauscht. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit IFN γ stimuliert. Anhand der *stat1*-mRNA Expression wurde die Expression von rekombinantem STAT1 verifiziert.

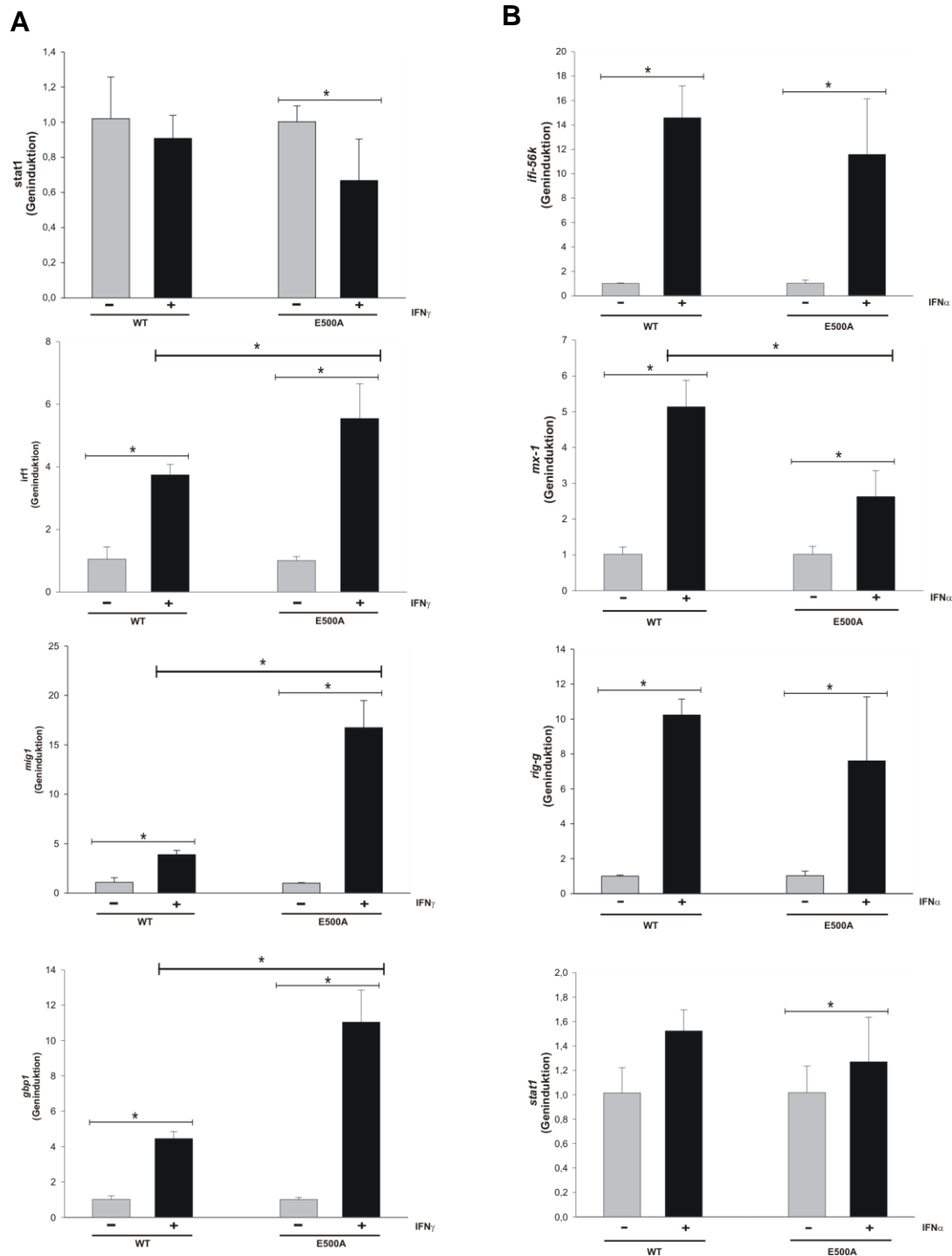


Abb. 3.23: Die differentielle Genaktivierung von STAT1-E500A ist abhängig von der Art des stimulierenden Zytokins. U3R-Zellen wurden mit den entsprechenden pcDNA3.1-Plasmiden transfiziert und 24 h danach das Vollmedium gegen 1 % FBS-haltiges Medium getauscht. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder unbehandelt oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ (A) bzw. mit 5 ng/mL IFN α (B) stimuliert. RNA wurde aus den Zellen isoliert, daraus cDNA hergestellt und die Expression der oben genannten Gene mittels *real-time*-PCR überprüft. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Werte der *gapdh*-Messung normiert. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Auch *in vivo* weist STAT1-E500A eine im Gegensatz zu STAT1-WT signifikant verbesserte transkriptionelle Aktivität nach Stimulation der Zellen mit IFN γ auf ($p < 0,02$) (**Abb. 3.23 (A)**). Um zu überprüfen, ob die verbesserte transkriptionelle Aktivität ein generelles Phänomen von STAT1-E500A ist oder vom verwendeten Zytokin abhängt, wurde in weiteren Versuchen die transkriptionelle Aktivität nach Stimulation mit IFN α untersucht. Die Stimulation mit IFN γ führt bekanntermaßen zur Bildung von STAT1-Homodimeren, IFN α induziert als Ligand nach Rezeptorbindung dagegen die Bildung von STAT1-STAT2-Heterodimeren.

Die Stimulation mit IFN α resultierte in keiner verbesserten Genaktivierung von STAT1-E500A (**Abb. 3.23 (B)**), sondern führte zu einer unveränderten bis sogar verminderten transkriptionellen Aktivität. Der Effekt der verbesserten transkriptionellen Aktivität durch Einführung einer Mutation in Position 500 von STAT1 betrifft demnach nur den IFN γ -vermittelten Weg und wird nicht nach IFN α -Stimulation beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem weiteren Versuch die konstitutive Zielgenaktivierung überprüft. Die Aktivierung von Apoptosegenen durch STAT1 ist unabhängig von der IFN-Stimulation (Kumar et al., 1997). U3R-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-STAT1-WT- und -STAT1-E500A-Plasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion wurde der Serumgehalt des Kulturmediums von 10 % auf 1 % reduziert. RNA wurde extrahiert, cDNA hergestellt und die Genexpression der Apoptosegene *ice*, *ich* und *cyp32* mittels *real-time*-PCR überprüft. In **Abb. 3.24** ist das Ergebnis der *real-time*-PCR graphisch dargestellt. Wie man sieht, ist kein signifikanter Unterschied in der konstitutiven Zielgenaktivierung von STAT1-E500A und STAT1-WT zu beobachten ($p \geq 0,05$).

Die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A ist demnach nur nach IFN γ -Stimulation zu beobachten, betrifft aber nicht Zellen, die mit IFN α stimuliert wurden und konnte auch nicht für die STAT1-regulierte, Zytokin-unabhängige Induktion von Caspase-Genen gefunden werden.

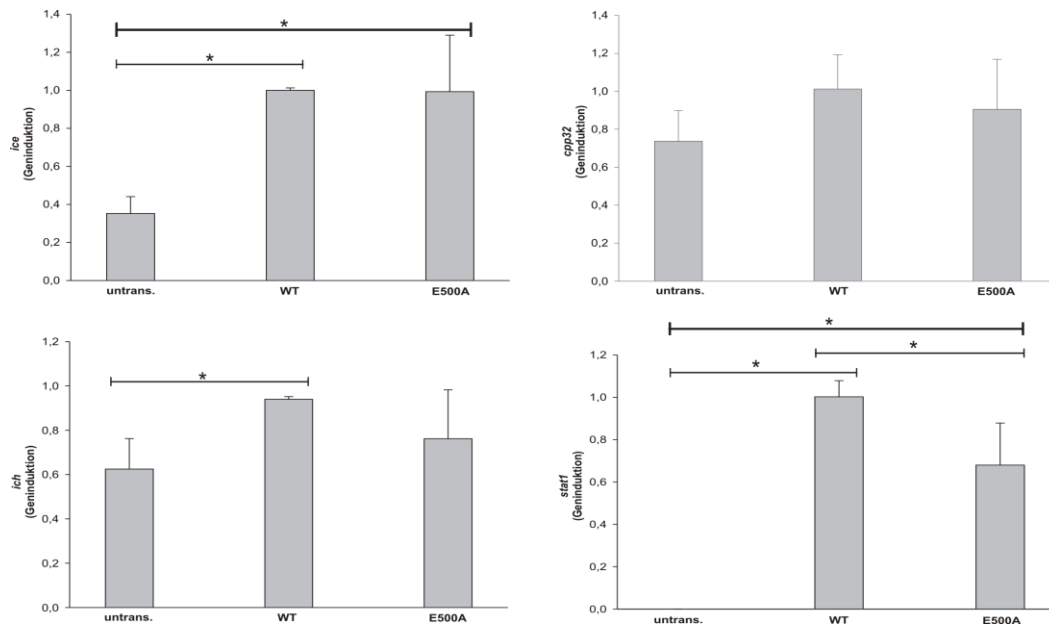


Abb. 3.24: IFN-unabhängige Zielgenaktivierung von STAT1-E500A. U3R-Zellen wurden mit den angegebenen pcDNA3.1-Plasmiden transfiziert und 24 h danach der Serumgehalt des Kulturmediums auf 1 % FBS vermindert. Am nächsten Tag wurde RNA aus den Zellen isoliert, cDNA hergestellt und die Expression der oben genannten Gene mittels *real-time*-PCR überprüft. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Werte der *gapdh*-Messung normiert. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

3.3.2 Die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A ist nicht auf eine Veränderung des Phosphorylierungsniveaus oder der Kernakkumulation zurückzuführen

Eine mögliche Ursache für die verbesserte transkriptionelle Aktivität könnte eine Hyperphosphorylierung oder verlängerte Kinetik der Kernakkumulation sein. Deshalb wurde die Phosphorylierung mittels Phospho-STAT1-spezifischem Western-Blot überprüft. Dazu wurden HeLa-S3-Zellen mit STAT1-GFP-exprimierenden Plasmiden transfiziert und im Intervall mit IFN γ stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Staurosporin behandelt. Die Phosphorylierung der gewonnenen Proteinextrakte wurde mittels Western-Blot überprüft.

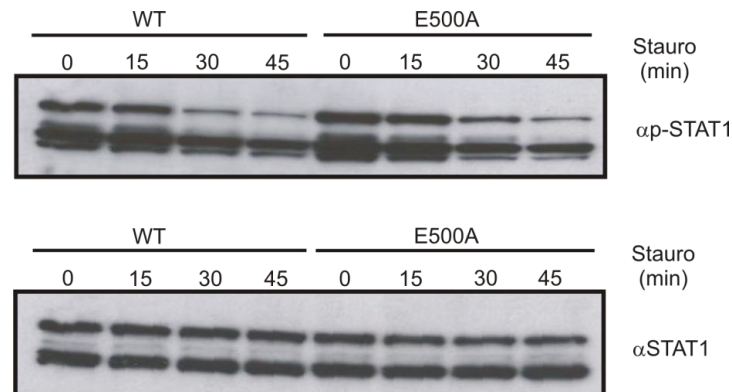


Abb. 3.25: Das Phosphorylierungsniveau von STAT1-E500A ist nicht verändert. STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin behandelt. Aus Gesamtzell-extrakten wurde die Menge an Phospho-STAT1 mittels Western-Blot analysiert. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Anhand der **Abb. 3.25** sieht man, dass die Dephosphorylierungskinetik von STAT1-E500A-GFP unter Bedingungen der Staurosporin-Behandlung $\text{IFN}\gamma$ -prästimulierter Zellen vergleichbar mit der von STAT1-WT-GFP ist. Grundsätzlich liegt also keine Hyperphosphorylierung der Mutante vor. In **Abb. 3.26** wird deutlich, dass auch die *In-vivo*-Dephosphorylierungskinetik von STAT1-E500A nicht von der *in vitro* abweicht. Durch Zugabe der isolierten TC-Protein-Tyrosin-Phosphatase zu Extrakten von $\text{IFN}\gamma$ -prästimulierten Zellen kommt es zu einer Abnahme des Phospho-STAT1-Signals, die sich nicht wesentlich zwischen beiden STAT1-Molekülen unterscheidet.

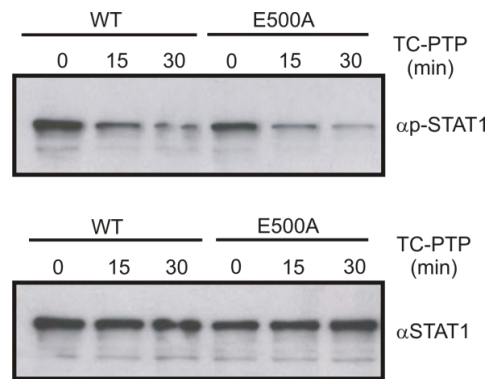


Abb. 3.26: Die *In-vitro*-Dephosphorylierungsrate von STAT1-E500A entspricht der von STAT1-WT. U3R-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-E500A-GFP transfiziert und für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden für die angegebenen Zeiten mit 2 U TC-PTP bei 30 °C inkubiert und mittels Western-Blot analysiert. Die obere Reihe zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist die gleiche Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Die vorherige Beobachtung einer differentiellen, Zytokin-abhängigen Genexpression von STAT1-E500A (siehe **Abb. 3.23**) ließ mich die Phosphorylierung nach IFN α -Stimulation überprüfen. Zusätzlich wurde in weiteren Western-Blot-Experimenten die Phosphorylierung nach EGF-Stimulation bestimmt (**Abb. 3.27**).

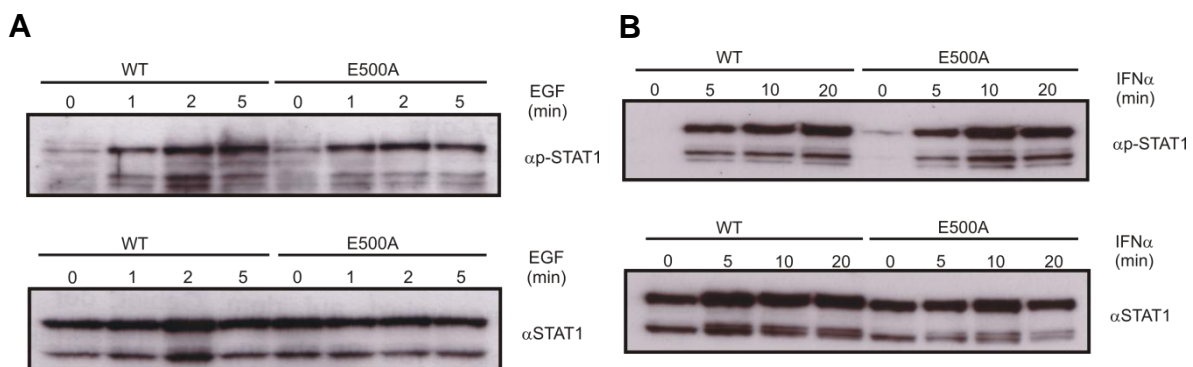


Abb. 3.27: Die Stimulation mit IFN α (A) und EGF (B) zeigt keinen Unterschied bezüglich des Phosphorylierungsniveaus von STAT1-E500A im Vergleich zu STAT1-WT. STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 5 ng/mL IFN α oder 100 ng/mL EGF stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden gewonnen und die Phosphorylierung mittels Western-Blot untersucht. Die obere Reihe zeigt jeweils die Western-Blots mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld sind die gleichen Blot-Membranen nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

Nach IFN α - und EGF-Stimulation von STAT1-E500A war verglichen mit STAT1-WT kein Unterschied in der Phosphorylierungskinetik zu erkennen. Aus diesem Grund erfolgte die Stimulation für die weitere Klärung des Phänotyps von STAT1-E500A nur noch mit dem Typ-II-Interferon IFN γ .

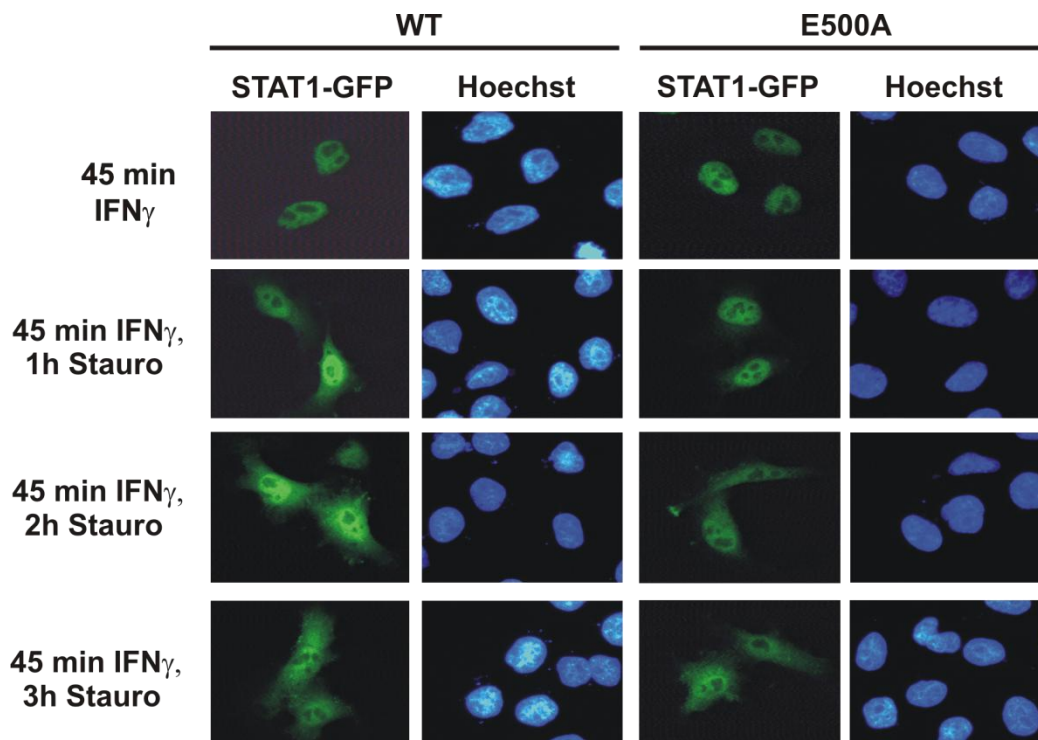


Abb. 3.28: STAT1-WT und STAT1-E500A weisen die gleiche Staurosporinsensitivität beim Zusammenbruch der IFN γ -induzierten Kernakkumulation auf. Transient mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-E500A-GFP transfizierte HeLa-S3-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und nachfolgend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Danach wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt.

Da eine Hyperphosphorylierung als Ursache für die verbesserte transkriptionelle Aktivität in IFN γ -stimulierten Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurde die Kinetik der Kernakkumulation überprüft. Dazu wurden erneut STAT1-GFP-kodierende Plasmide verwendet, da man mit ihrer Hilfe die intrazelluläre Verteilung und die Kinetik der Kernakkumulation fluoreszenzmikroskopisch untersuchen kann. STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden nach IFN γ - und Staurosporin-Behandlung direkt fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auch in diesem Versuch ist kein Unterschied zwischen STAT1-WT und STAT1-E500A zu erkennen (**Abb. 3.28**). Beide wiesen nach IFN γ -Stimulation eine Lokalisation im Zellkern auf. Nach Staurosporingabe kam es zu einem raschen

Zusammenbruch der Kernakkumulation von STAT1-WT-GFP und STAT1-E500A-GFP, der sich in seiner Kinetik nicht unterschied. Nach 3 h Staurosporininkubation wiesen beide STAT1-GFP-Konstrukte wieder eine panzelluläre Verteilung auf.

GFP-Fusionsproteine besitzen im Vergleich zu endogenem STAT1 eine verringerte Exportrate (Köster und Hauser, 1999; Begitt et al., 2000; Meyer et al., 2007). Um auszuschließen, dass der GFP-Anteil des Fusionsproteins einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von STAT1 besitzt, wurde die Kernakkumulation von unmarkiertem, nativem STAT1 unter Einsatz von pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden überprüft. Dazu wurden U3R-Zellen, die zuvor mit den pcDNA3.1-Expressionsvektoren der jeweiligen STAT1-Moleküle transfiziert wurden, mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, bevor die Zellen mit Staurosporin behandelt wurden. Nach Immunfärbung mit STAT1-spezifischem Antikörper wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

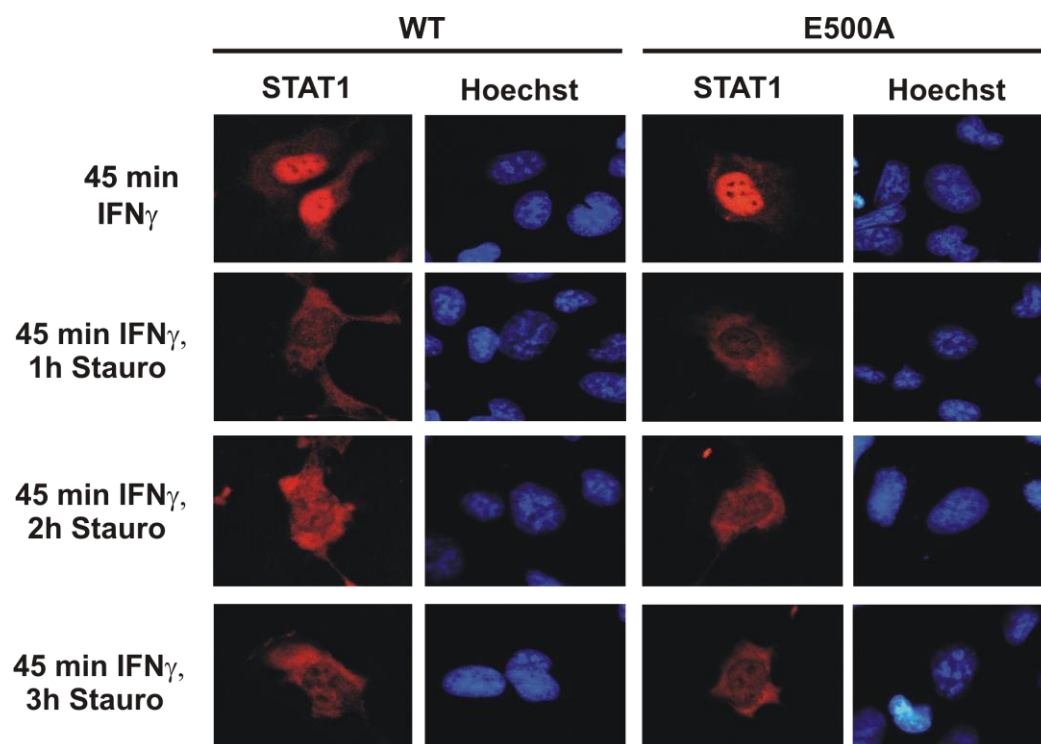


Abb. 3.29: Die immunzytochemische Untersuchung weist keinen Unterschied in der Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT und STAT1-E500A auf. STAT1-WT- und STAT1-E500A-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μM Staurosporin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Die STAT1-Lokalisation wurde immunzytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert. Das Anfärben der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Farbstoff.

Wie man in **Abb. 3.29** sieht, akkumulieren STAT1-WT und STAT1-E500A nach IFN γ -Stimulation in den Kern. Bereits nach 1 h Staurosporin-Behandlung haben beide Proteine eine panzelluläre Verteilung eingenommen.

3.3.3 Die DNA-Bindung von STAT1-E500A ist vergleichbar mit der von STAT1-WT

Da eine Hyperphosphorylierung und eine verlängerte Kinetik der Kernakkumulation als Ursache für die verbesserte transkriptionelle Aktivität nach IFN γ -Stimulation ausgeschlossen werden konnte, wurde im nächsten Schritt die DNA-Bindung untersucht. Anhand einiger Mutanten von STAT1 konnte gezeigt werden, dass die Stärke der DNA-Bindung einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität haben kann (Yang et al., 2002).

Als erstes wurde überprüft, ob STAT1-E500A überhaupt in der Lage ist an DNA zu binden und wenn ja, ob STAT1-E500A die Affinität zur Bindung an GAS-Stellen behält. Dazu wurden EMSA-Experimente unter Verwendung von drei unterschiedlichen Sonden durchgeführt. Eine Sonde bestand aus einer einfachen GAS-Stelle (M67 oder GAS), die zweite aus einer GAS-nonGAS-Stelle. Zur Untersuchung der kooperativen DNA-Bindung stand eine Sonde mit zweifacher GAS-Bindestelle zur Verfügung. Die kooperative DNA-Bindung resultiert aus der Fähigkeit der Proteine, stabile Tetramere an Tandem-GAS-Stellen zu bilden. Unspezifische DNA-Bindungen wurden mit Hilfe einer Sonde, die zwei modifizierte GAS-Stellen besitzt (2xnonGAS), untersucht.

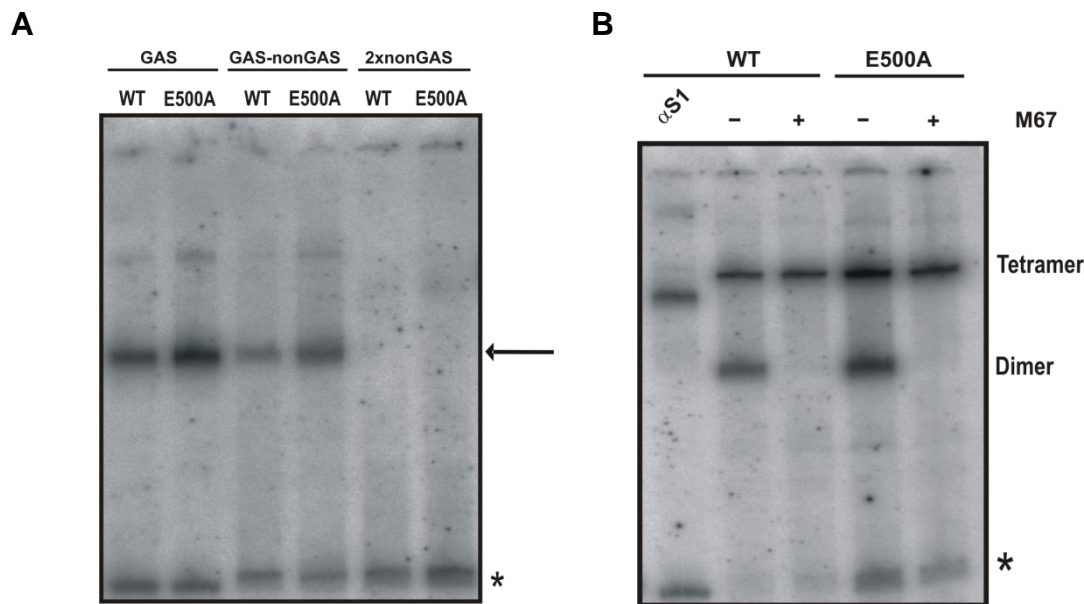


Abb. 3.30: Die Affinität zu GAS-Stellen (A) und die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung (B) sind durch die Mutation E500A nicht beeinträchtigt. Nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierenden U3R-Zellen gewonnen und diese für 15 min mit den angegebenen Sonden inkubiert. (A) Dabei handelt es sich um eine einfache GAS-Bindestelle (GAS), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) und einer zweifachen Nicht-GAS-Bindestelle (2xnonGAS). (B) Für die Kooperation wurden die Proben anschließend noch für 30 min mit einem 750-fachen Überschuss an unmarkierter Sonde inkubiert. Die Proben wurden mittels nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Pfeil markiert dimere STAT1-DNA-Komplexe; Sterne unspezifische Banden.

Zur Überprüfung der DNA-Bindung von STAT1-E500A sowie der kooperativen DNA-Bindung wurden STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierende U3R-Zellen für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und die Zellextrakte für Gelshift-Experimente verwandt. Die Extrakte wurden für 15 min mit den entsprechenden Sonden inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung der kooperativen DNA-Bindung wurden zusätzlich Kooperationsexperimente durch Zugabe eines 750-fachen molaren Überschusses an unmarkierter Sonde durchgeführt.

In **Abb. 3.30 (A)** ist zu sehen, dass STAT1-E500A eine erhaltene Affinität zu GAS-Stellen besitzt. GAS-nonGAS-Bindestellen werden mit verminderter Affinität und 2xnonGAS-Stellen gar nicht erkannt. Des Weiteren wird durch die Einführung einer Mutation in Position 500 die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung nicht verändert (**Abb. 3.30 (B)**).

Yang et al. beschrieben 2002 eine Mutante der Linker-Domäne von STAT1, die aufgrund einer schnelleren Dissoziations-Rate von DNA in ihrer transkriptionellen Aktivität erheblich eingeschränkt ist. Da STAT1-E500A eine verbesserte transkriptionelle Aktivität aufweist, wurde mittels eines weiteren EMSA-Experiments überprüft, ob die Off-Rate von STAT1-E500A durch die Mutation beeinflusst ist. Dazu wurden STAT1-WT-GFP- und STAT1-E500A-GFP-exprimierende U3R-Zellen für 45 min mit IFN γ stimuliert und die daraus gewonnenen Zellextrakte für 15 min mit M67-Sonde und im Anschluss für die angegebenen Zeiten mit unmarkierter Sonde inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Autoradiographie in Vakuum-getrockneten Polyacrylamidgelen.

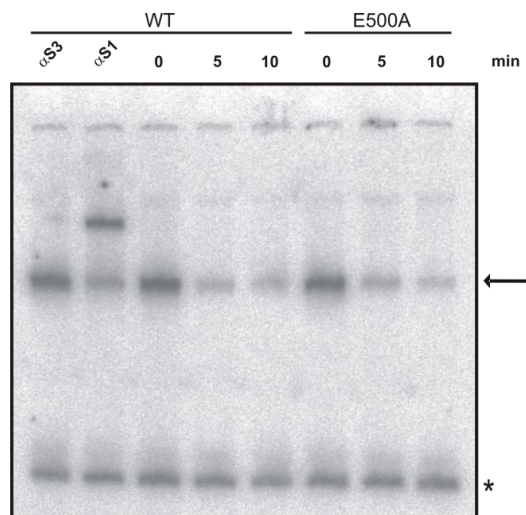


Abb. 3.31: Die Dissoziationsrate von GAS-Bindestellen unterscheidet sich nicht zwischen STAT1-E500A und STAT1-WT. Gesamtzellextrakte von STAT1-WT- und STAT1-E500A-exprimierenden U3R-Zellen, die mit 5 ng/mL IFN γ prästimuliert wurden, wurden für 15 min bei RT mit M67-Sonde und im Anschluss für die angegebenen Zeiten mit 750-fachem Überschuss einer unmarkierten M67-Sonde inkubiert. Die Proben wurden mittels nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt. Der Pfeil markiert die STAT1-DNA-Komplexe. Der Stern verweist auf eine unspezifische Bande.

STAT1-E500A weist, wie in **Abb. 3.31** demonstriert, keine Veränderung der Dissoziationsrate von DNA im Vergleich zum unmutierten Protein auf.

3.4 Charakterisierung von STAT1-F364A

In einem zweiten Versuchsteil dieser Arbeit wurde anhand der Kristallstruktur von STAT1 ein Phenylalaninrest in Position 364 an der Oberfläche der DNA-Bindedomäne identifiziert (**Abb. 3.32**), der nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligt ist, aber eine hydrophobe Tasche aufspannt. Durch Sequenzvergleich der humanen STAT-Familie (**Tab. 3.3**) konnte festgestellt werden, dass bei fünf Mitgliedern der STAT-Familie mit Isoleuzin ebenfalls ein hydrophober Rest an dieser Stelle konserviert ist, während sich bei STAT6 hier ein Methioninrest befindet. Der Einfluss dieses Restes auf die DNA-Bindung wurde durch Mutagenese einer systematischen Analyse unterzogen, deren Ergebnisse im Folgenden geschildert werden.

STAT1	359	K	.	.	.	V	K	V	L	F	D	K	D	V	N	E
STAT2	358	T	.	.	.	V	E	V	S	I	D	R	N	.	.	.
STAT3	364	K	.	.	.	I	K	V	C	I	D	K	D	S	G	D
STAT4	359	K	.	.	.	V	K	A	S	I	D	K	N	.	.	.
STAT5a	365	N	P	P	Q	V	K	A	T	I	I	S	E	Q	Q	A
STAT5b	365	N	P	P	Q	V	K	A	T	I	I	S	E	Q	Q	A
STAT6	307	K	P	P	L	V	R	A	D	M	V	T	E	K	Q	A

Tab. 3.3: Sequenzhomologie einer Region in der DNA-Bindedomäne von STAT-Proteinen.

Ein hydrophober Aminosäurerest in Position 364 ist bei den Mitgliedern der STAT-Familie konserviert. Bei STAT1 befindet sich hier ein Phenylalaninrest, bei STAT6 ein Methionin- und bei den fünf anderen STAT-Proteinen ein Isoleuzinrest.

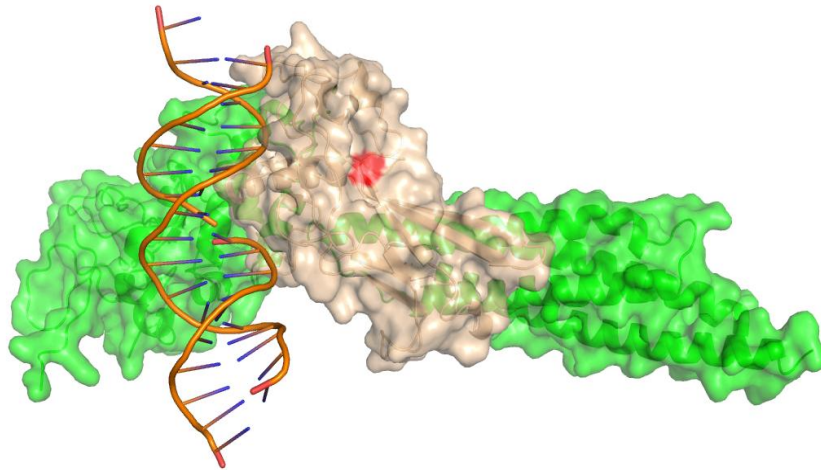


Abb. 3.32: Kristallstruktur von STAT1 mit Lokalisation des konservierten hydrophoben Aminosäurerestes F364. Das DNA-gebundene Monomer ist in grün dargestellt, die DBD in Weiß hervorgehoben. Der Phenylalaninrest in Position 364 ist rot dargestellt.

3.4.1 *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimente der STAT1-Mutante F364A zeigen eine normale Dephosphorylierungskinetik

Die Stimulation von Zellen mit Interferon führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1, gefolgt von dessen Dimerisierung, transienten Kernakkumulation und der Expression von IFN-responsiven Genen (Darnell, 1997; Levy und Darnell, 2002). Da die Phosphorylierung der initiierte Schritt der Signaltransduktion ist, wurde zunächst das Phosphorylierungssignal von STAT1-F364A untersucht. Dazu wurde durch Mutagenese ein Expressionsvektor generiert, der das GFP-Fusionsprotein STAT1-F364A kodiert, und dieses Plasmid in HeLa-S3-Zellen transient transfiziert. Nach 45-minütiger Stimulation mit IFN γ und nachfolgender Behandlung mit Staurosporin wurde die Phosphorylierung von STAT1 mittels Western-Blot analysiert. Um sicher zu gehen, dass gleiche Mengen an STAT1 in den Extrakten enthalten sind, wurde nach stringenter Abwaschung des Phospho-STAT1-Antikörpers die Western-Blot-Membran erneut, dieses mal mit einem STAT1-Antikörper inkubiert. Bei Staurosporin handelt es sich um einen Breitbandkinaseinhibitor; durch die Behandlung mit Staurosporin wird eine Rephosphorylierung verhindert und dadurch eine Bestimmung der Dephosphorylierungskinetik ermöglicht (Haspel et al., 1996). Als Kontrolle für

eine Hyperphosphorylierung wurde die Mutante T385A gewählt, die in der Literatur allerdings bislang noch nicht charakterisiert wurde, sowie die DNA-Bindemutante DNA^{Minus} (Meyer et al., 2005; Mao et al., 2005).

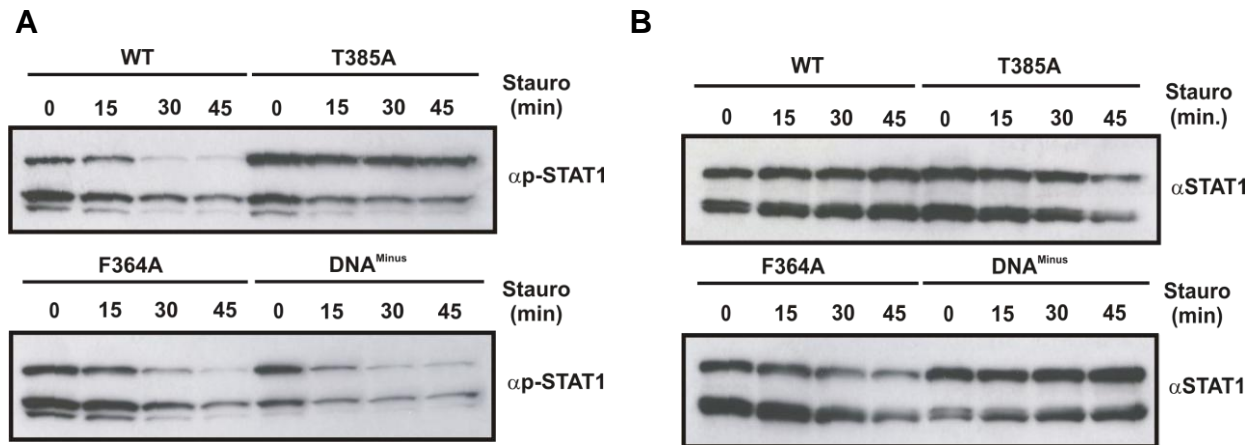


Abb. 3.33: *In-vivo*-Dephosphorylierungsassay von STAT1-T385A-GFP, STAT1-F364A-GFP und STAT1-DNA^{Minus}-GFP. Die das jeweilige STAT1-Protein exprimierenden HeLa-S3-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und diese in Western-Blot-Analysen untersucht. (A) zeigt den Westen-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. (B) zeigt die gleichen Membranen nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper.

Wie man **Abb. 3.33** entnehmen kann, zeigt STAT1-T385A-GFP auch bei längerer Staurosporininkubation nur eine geringe Abnahme der Stärke des Phosphorylierungssignals. Die Abnahme der Phosphorylierung von STAT1-F364A-GFP hingegen gleicht der von STAT1-WT-GFP sowie jener der DNA-Bindemutante STAT1-DNA^{Minus}-GFP.

Des Weiteren wurden mit diesen Mutanten zusätzlich zu den Dephosphorylierungsassays *in vivo* noch solche *in vitro* durchgeführt. Dazu wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-GFP transfizierten U3R-Zellen verwendet. Die U3R-Zellen wurden dafür mit den jeweiligen STAT1-GFP-Plasmiden transfiziert, am Folgetag für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert und daraus Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Extrakte wurden dann für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit TC-PTP für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse.

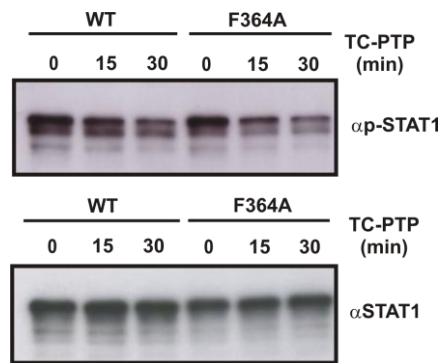


Abb. 3.34: *In-vitro*-Dephosphorylierungsassay von STAT1-WT und STAT1-F364A . STAT1-WT-GFP und STAT1-F364A-GFP-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL mit IFN γ behandelt und anschließend Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Extrakte wurden für die angegebenen Zeiten bei 30 °C mit TC-PTP inkubiert und mittels Western-Blot analysiert. Das obere Feld zeigt den Western-Blot mit Phospho-STAT1-Antikörper. Im unteren Feld ist dieselbe Blot-Membran nach Entfernen des Antikörpers und erneuter Inkubation mit STAT1-spezifischem Antikörper gezeigt.

In **Abb. 3.34** ist die Dephosphorylierungskinetik von STAT1-F364A-GFP im Vergleich zum STAT1-WT-GFP gezeigt. Wie man der Abbildung entnehmen kann, weist STAT1-F364A-GFP die gleiche Dephosphorylierungskinetik wie STAT1-WT-GFP auf.

3.4.2 STAT1-F364A besitzt eine normale Kinetik der Kernakkumulation

Die Zytokin-Stimulation mit IFN γ führt in Säugerzellen zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 durch Jak2 und einer Homo-Dimerisierung von zwei STAT1-Molekülen. STAT1-Homodimere werden dann als transkriptionell aktive Komplexe in den Zellkern transportiert, wo sie IFN γ -responsive Zielgene in ihrer Expression modulieren (Darnell, 1997; Levy und Darnell, 2002). Für die Untersuchung der IFN γ -induzierbaren Kernakkumulation wurden HeLa-S3-Zellen mit STAT1-GFP-Expressionsplasmiden transfiziert und nach Interferon- und Staurosporin-Behandlung direkt fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Köster und Hauser, 1999). Zu beachten ist, dass die GFP-Fusionsproteine von STAT1 eine gegenüber nativen STAT1-Molekülen verringerte Exportrate besitzen (Begitt et al., 2000; Meyer et al., 2007).

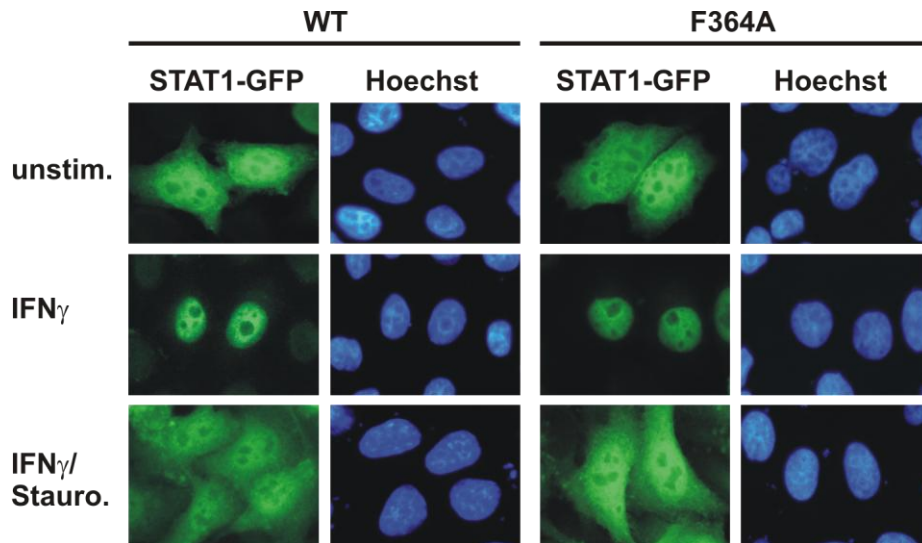


Abb. 3.35: Die Kinetik der Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation und Staurosporin-Behandlung unterscheidet sich nicht zwischen STAT1-WT-GFP und STAT1-F364A-GFP. STAT1-WT-GFP- und STAT1-F364A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden unbehandelt belassen (obere Reihe), für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (mittlere Reihe) oder für 45 min mit IFN γ und anschließend für 2 h mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt.

In **Abb. 3.35** sieht man, dass STAT1-WT-GFP und STAT1-F364A-GFP im unstimulierten Zustand panzellulär verteilt sind. Eine Stimulation mit IFN γ führte bei beiden STAT1-Derivaten zu einer deutlich sichtbaren nukleären Lokalisation, bei der die Nukleoli ausgespart blieben. Der Zusammenbruch der Kernakkumulation nach Staurosporininkubation unterscheidet sich also nicht zwischen beiden GFP-Addukten. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von STAT1-T385A-GFP dagegen ergaben, dass das STAT1-T385A-GFP auch nach 3h Staurosporininkubation noch im Zellkern persistiert (**Abb. 3.36**).

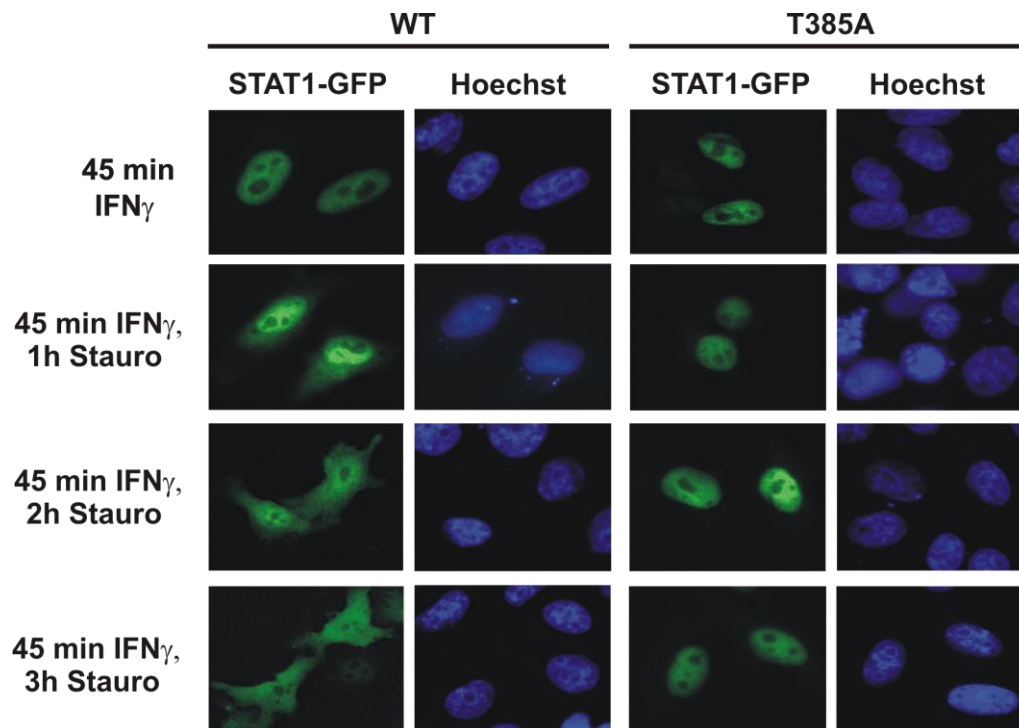


Abb. 3.36: STAT1-T385A-GFP weist nach Staurosporin-Behandlung gegenüber STAT1-WT-GFP eine deutlich verlängerte Phase der Kernakkumulation auf. STAT1-WT-GFP- und STAT1-T385A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (1. Reihe) oder für 45 min mit IFN γ und anschließend für 1 h (2. Reihe), 2 h (3. Reihe) oder für 3 h (4. Reihe) mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt.

Um zu bestätigen, dass sich die F364A-Mutante in Bezug auf die Kinetik der nukleären Akkumulation nach IFN γ -Gabe nicht vom Wildtyp-Protein unterscheidet, wurde die intrazelluläre Lokalisation von unmarkierten STAT1-Molekülen in U3R-Zellen, die zuvor mit den entsprechenden pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden transfiziert worden waren und nachfolgend mit Interferon behandelt wurden, immunzytochemisch verfolgt.

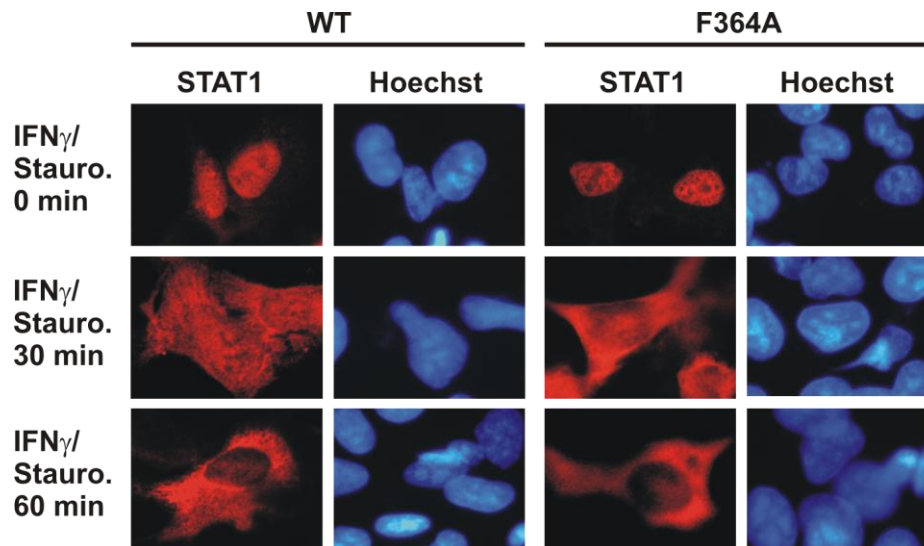


Abb. 3.37: Die immunzytochemische Untersuchung weist keinen Unterschied in der Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT und STAT1-F364A auf. STAT1-WT- und STAT1-F364A-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (obere Reihe) oder für 45 min mit IFN γ und anschließend für 30 min (mittlere Reihe) bzw. 60 min (untere Reihe) mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Die STAT1-Lokalisation wurde immunzytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Farbstoff.

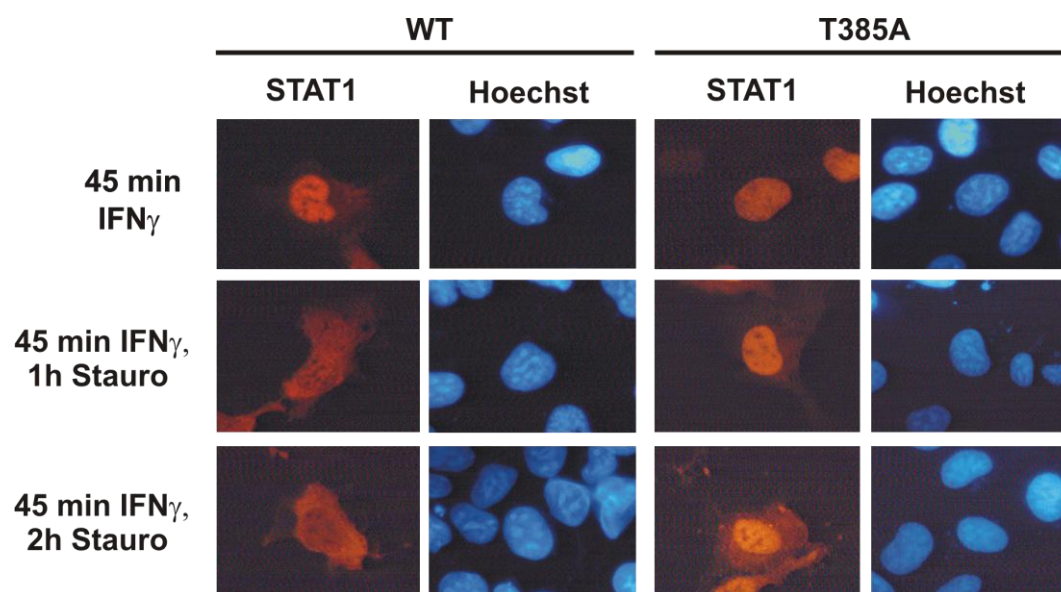


Abb. 3.38: STAT1-T385A weist in der immunzytochemischen Untersuchung eine verlängerte Phase der Kernakkumulation auf. STAT1-WT- und STAT1-T385A-exprimierende U3R-Zellen wurden für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (obere Reihe) oder für 45 min mit IFN γ und anschließend für 1 h (mittlere Reihe) bzw. 2 h (untere Reihe) mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die STAT1-Lokalisation immunzytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Farbstoff.

Die immunzytochemischen Ergebnisse bestätigen sowohl für STAT1-F364A (**Abb. 3.37**) als auch für STAT1-T385A (**Abb. 3.38**) die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse. Der GFP-Anteil der Fusionsproteine hat demnach keinen Einfluss auf die nukleäre Akkumulationsphase.

3.4.3 STAT1-F364A besitzt eine verminderte Affinität der DNA-Bindung bei erhaltener GAS-Erkennung

STAT1-Dimere binden spezifisch an palindrome DNA-Sequenzen, so genannte GAS-Stellen (*gamma activated sites*). Die kooperative DNA-Bindung resultiert aus der Fähigkeit der Proteine, stabile Tetramere an Tandem-GAS-Stellen zu bilden. Die Untersuchung der DNA-Bindung erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe von Gel-retardations-Experimenten (EMSA). Dazu wurden unterschiedliche [³²P]-markierte DNA-Sonden eingesetzt, wie sie bereits in den vorhergehenden Experimenten beschrieben wurden. Eine Sonde bestand aus einer einfachen GAS-Stelle (M67), die zweite aus einer GAS-nonGAS-Stelle. Zur Untersuchung der kooperativen DNA-Bindung stand eine Sonde mit zweifacher GAS-Bindestelle zur Verfügung. Unspezifische DNA-Bindungen konnten mit Hilfe einer Sonde, die zwei modifizierte GAS-Stellen besitzt, untersucht werden.

Um zu untersuchen, wie sich die DNA-Bindung von STAT1-F364A verhält, wurden U3R-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-F364A-GFP transfiziert und für 45 min mit IFN_γ stimuliert. Die Gesamtzellextrakte wurden mit der radioaktiv markierten Sonde inkubiert und die Bindung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese autoradiographisch sichtbar gemacht. Zum besseren Vergleich wurden in allen EMSA-Experimenten vergleichbare Extraktmengen aufgetragen.

In **Abb. 3.39** kann man erkennen, dass STAT1-F364A eine verminderte Affinität zur DNA-Bindung besitzt (Banden 2 und 4). Im Gegensatz zu anderen DNA-Bindemutanten bleibt die Erkennung von GAS-Stellen aber erhalten (Bande 6).

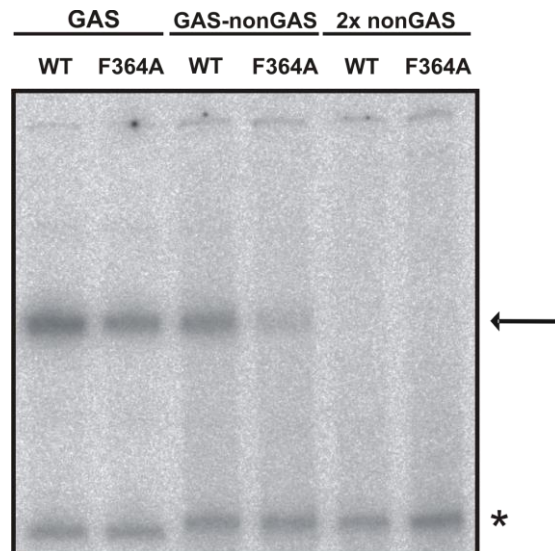


Abb. 3.39: Verminderte Affinität der DNA-Bindung von STAT1-F364A. Nach 45 minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP- und STAT1-F364A-GFP-exprimierenden U3R-Zellen hergestellt und diese für 15 min mit den angegebenen Sonden inkubiert. Dabei handelt es sich um eine einfache GAS-Bindestelle (GAS), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) und einer zweifachen Nicht-GAS-Bindestelle (2xnonGAS). Die Proben wurden mittels eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt. Der Pfeil markiert die STAT1-DNA-Komplexe, der Stern eine unspezifische Bande.

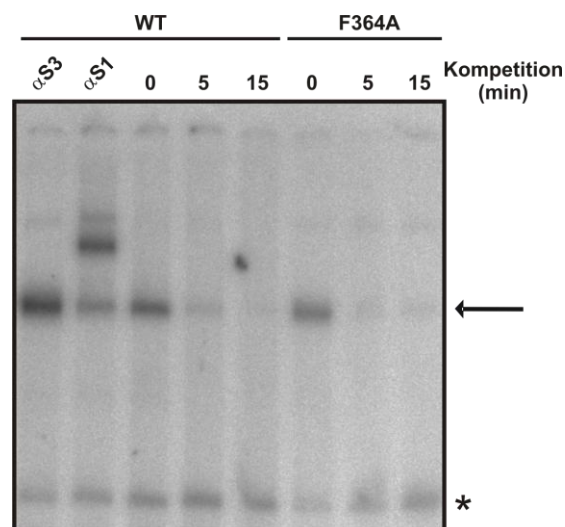


Abb. 3.40: Gleiche Dissoziationsrate von DNA von STAT1-WT und STAT1-F364A. Nach 45 minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP- und STAT1-F364A-GFP-exprimierenden U3R-Zellen hergestellt und diese für 15 min mit [32 P]-markierter M67-Sonde inkubiert. Danach wurde ein 750-facher molarer Überschuss von unmarkierter M67-Sonde zugegeben und für die angegebenen Zeiten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil markiert die Laufhöhe der STAT1-DNA-Komplexe. $\alpha S1$ bezeichnet einen Super-shift mit STAT1-spezifischem Antikörper. $\alpha S3$ bezeichnet einen Kontroll-Super-shift mit STAT3-spezifischem-Antikörper. Der Stern markiert eine unspezifische Bande.

Um zu überprüfen, ob die reduzierte DNA-Bindeaffinität von STAT1-F364A mit einer erhöhten Dissoziationsrate von DNA zusammenhängt, wurde ein Kompetitions-Gel-Shift-Experiment in Gegenwart eines 750-fachen molaren Überschusses an nicht radioaktiv markierter M67-DNA durchgeführt.

Dieser Versuch zeigte, dass STAT1-WT und STAT1-F364A die gleiche Dissoziationsrate von DNA besitzen (**Abb. 3.40**). Die reduzierte GAS-Bindung kommt also durch eine verminderte Affinität an DNA zustande.

Mit Hilfe einer zweifachen GAS-Sonde konnte die kooperative DNA-Bindung untersucht werden. Wie in **Abb. 3.41** zu sehen ist, zeigt sich kein Unterschied in der DNA-Bindung von STAT1-WT-GFP und STAT1-F364A-GFP. Beide Proteine binden in dimerer Form an eine GAS-Stelle und als Tetramer an zwei GAS-Stellen in Tandemanordnung. Nach Zugabe eines 750-fachen molaren Überschusses an unmarkierter M67-Sonde bleibt der mittels kooperativer DNA-Bindung stabilisierte tetramere Komplex bestehen.

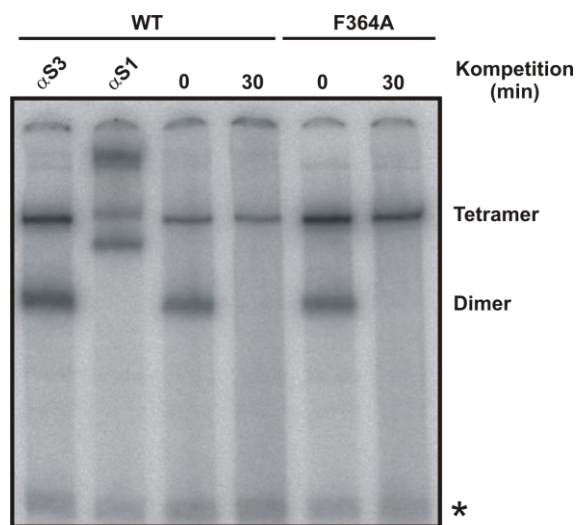


Abb. 3.41: Die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung bleibt bei der STAT1-Mutante F364A erhalten. Von U3R-Zellen, die GFP-Addukte von entweder STAT1-F364A bzw. STAT1-WT exprimieren, wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/mL IFN γ Gesamtzellextrakte hergestellt und diese für 15 min mit einer [32 P]-markierten Sonde bestehend aus einer zweifachen GAS-Bindestelle (2xGAS) inkubiert. Danach wurde zur Kompetition ein molarer Überschuss von unmarkierter M67-DNA für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Bindeverhalten der STAT1-Proteine autoradiographisch analysiert. α S1 bezeichnet einen Supershift mit STAT1-spezifischem Antikörper; α S3 einen Kontroll-Supershift mit STAT3-spezifischem Antikörper. Bei der oberen Bande handelt es sich um tetramere STAT1-Komplexe, bei der unteren um STAT1-Dimere. Der Stern markiert eine unspezifische Bande.

Einen weiteren Beweis für die verminderte DNA-Bindung von STAT1-F364A erbrachten die Untersuchungen eines GFP-Fusionsproteins von STAT1-F364A-NES. Diese NES-Fusionsproteine verfügen über ein hyperaktives nukleäres Exportsignal (NES), so dass diese STAT1-Exportmutanten unter der Stimulation mit IFN γ nicht akkumulieren. Es ist also keine Kernakkumulation mit IFN γ beobachtbar (siehe **Abb. 3.42** 2. Reihe). Durch Zugabe von Leptomycin B (LMB) lässt sich der hyperaktive Export inhibieren und führt zur Wiederherstellung eines Zytokin-induzierbaren, normalen Akkumulationsverhaltens.

In **Abb. 3.42** sieht man, dass aufgrund der Präsenz des NES weder STAT1-NES-WT noch STAT1-NES-F364A vor oder nach IFN γ -Behandlung im Zellkern lokalisiert sind. Gibt man LMB hinzu und hemmt somit den Export, findet man sämtliches STAT1-NES-WT-GFP im Zellkern. Das GFP-Addukt von STAT1-NES-F364A hingegen ist aufgrund der reduzierten DNA-Bindung nicht in der Lage trotz LMB-Behandlung im Kern zu akkumulieren.

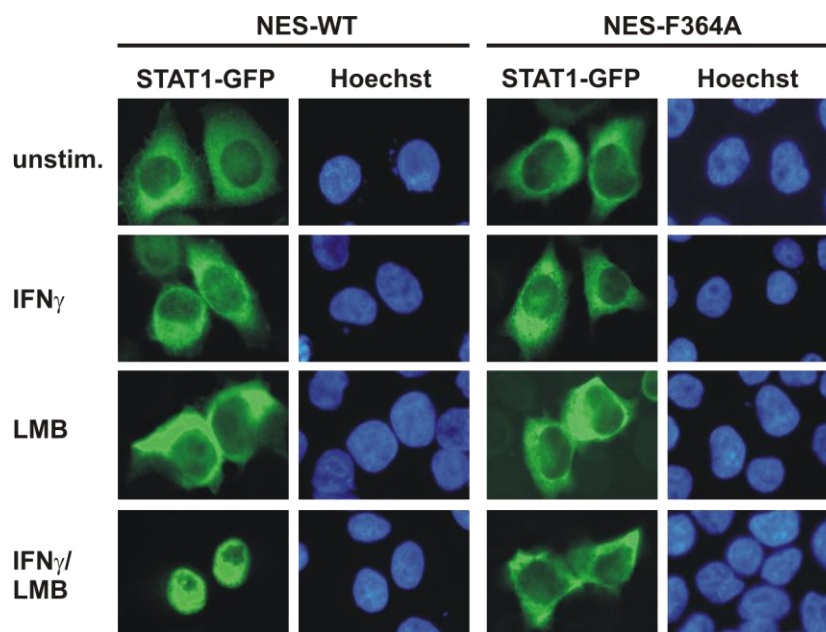


Abb. 3.42: NES-F364A zeigt mit IFN γ und LMB keine Kernakkumulation. STAT1-NES-WT-GFP- und STAT1-NES-F364A-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (1. Reihe), für 45 min mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (2. Reihe), für 45 min mit 10 μ g/mL LMB behandelt (3. Reihe) oder für 45 min mit 5ng/mL IFN γ und 10 μ g/mL LMB behandelt (4. Reihe). Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff gefärbt.

3.4.4 STAT1-F364A besitzt eine verminderte transkriptionelle Aktivität

Als nächster Schritt wurde mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays untersucht, welchen Einfluss die verringerte Affinität von STAT1-F364A zu DNA auf die transkriptionelle Aktivität besitzt. Dazu wurde ein Luciferase-Reporter benutzt, der durch einen synthetischen Promotor mit dreifacher GAS-Bindestelle im Abstand von 10 bp (3xLy6E) reguliert wird. Transient mit den Plasmiden pSTAT1-WT und pSTAT1-F364A transfizierte U3R-Zellen, denen pGAS3xLy6E und p β Gal kotransfiziert wurde, blieben entweder unbehandelt oder wurden für 6 h mit IFN γ stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationsphase wurde aus den zellulären Extrakten die Luciferase-Aktivität bestimmt und auf die β -Galactosidase-Aktivität normiert. In **Abb. 3.43** erkennt man, dass aufgrund der reduzierten DNA-Bindung von STAT1-F364A die transkriptionelle Aktivität signifikant vermindert ist ($p \leq 0,001$).

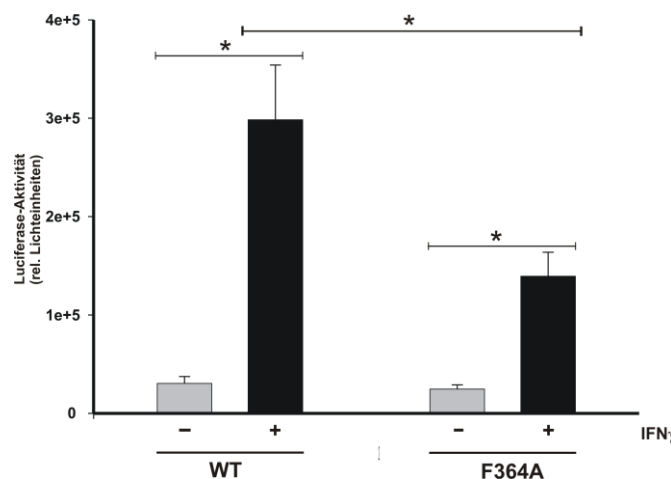


Abb. 3.43: Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-F364A ist im Reporter-Gen-Assay mit 3xLy6E-Promotor aufgrund der geringeren Affinität zu DNA vermindert. U3R-Zellen wurden mit pSTAT1-WT und pSTAT1-F364A sowie mit pGAS3xLy6E und p β Gal transfiziert und 16 -24 h danach unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Aus Zellextrakten wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und auf die β -Galactosidase-Aktivität in der gleichen Probe normiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils sechs Messungen aus unabhängigen Transfektionen von entweder unbehandelten (graue Balken) oder IFN γ -stimulierten (schwarze Balken) Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Des Weiteren wurden Reporter-gen-Assays mit einem nativen Promotor durchgeführt. Dieses Reporter-gen besteht aus einer trunkierten Form des Promotors für das humane Intrazelluläre-Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und besitzt eine kanonische GAS-Stelle (Hou et al., 1994; Van de Stolpe et al., 1994). Auch mit dem nativen Reporter-gen zeigte STAT1-F364A eine signifikant verminderte transkriptionelle Aktivität ($p = 0,002$; **Abb. 3.44**).

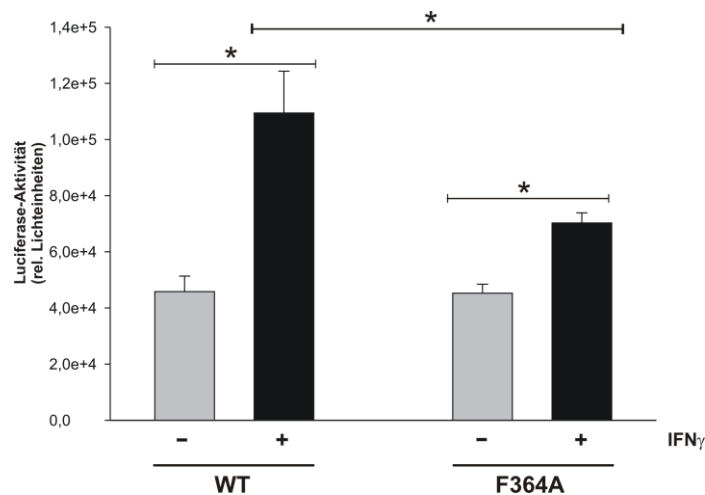


Abb. 3.44: Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-F364A ist im Reporter-gen-Assay mit einem nativen Promotor aufgrund der geringeren Affinität zu DNA vermindert. U3R-Zellen wurden mit STAT1-WT und STAT1-F364A sowie mit pIC-339 und p β Gal transfiziert und 16 -24 h danach unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Normiert wurde auf die β -Galactosidase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Transfektionen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Zur weiteren Überprüfung der transkriptionellen Aktivität von STAT1-F364A wurden mit Hilfe der *real-time*-PCR *in vivo* Experimente durchgeführt. Dabei wurden vier endogene, IFN γ -induzierbare Zielgene von STAT1 untersucht. U3R-Zellen, die zuvor mit pcDNA3.1-STAT1-WT oder pcDNA3.1-STAT1-F364A transfiziert wurden, wurden 16-24 h nach Austausch des Vollmediums gegen ein 1 % FBS-haltiges Medium für entweder 0 h oder 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Nach RNA-Isolierung, cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase und Amplifikation von spezifischen Zielgenen mittels PCR wurden die gemessenen Werte auf die jeweilige *gapdh*-Messung normiert. Dabei zeigte STAT1-F364A eine signifikant verminderte transkriptionelle Aktivität für *gbp1* und *mig1*, jedoch nicht in dem Maße wie bei den Reporter-gen-Assays. Die *irf1*-Expression zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied.

Anhand der *stat1*-mRNA Expression konnte das Expressionsniveau von STAT1 überprüft werden. Wie in **Abb. 3.45** demonstriert, konnte eine *stat1*-mRNA-Expression in allen Proben detektiert werden.

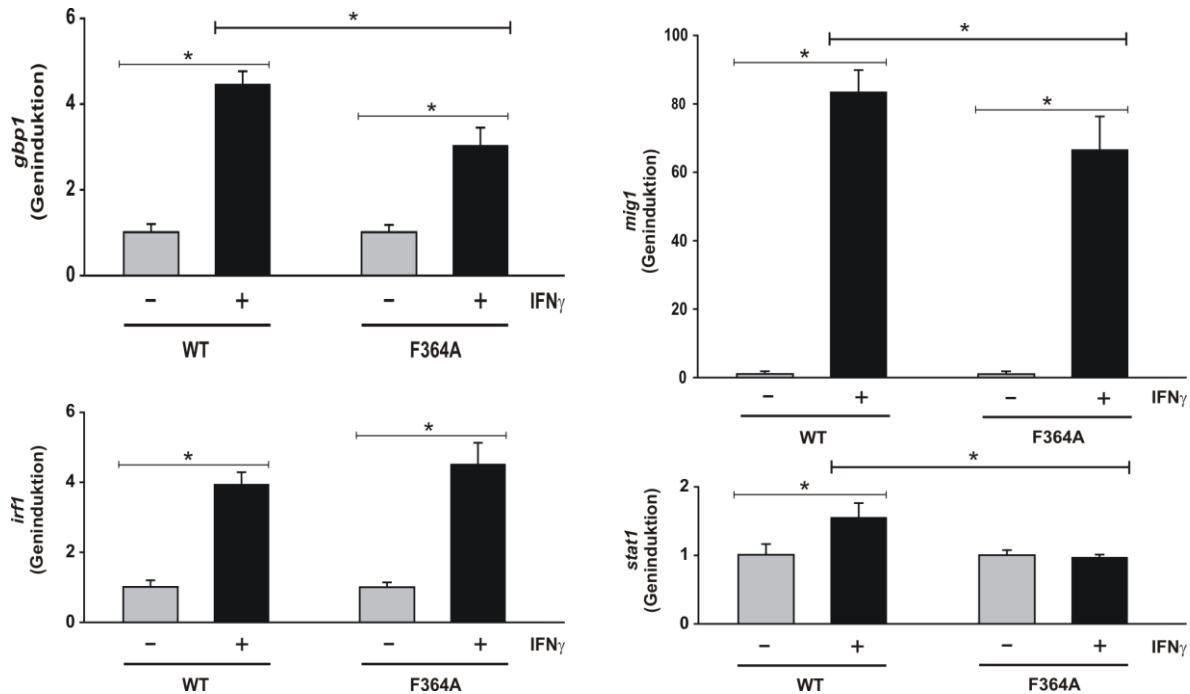


Abb. 3.45: Aktivierung endogener Zielgene durch STAT1-F364A. U3R-Zellen wurden mit den angegebenen pcDNA3.1-Plasmiden transfiziert und 24 h danach in 1 % FBS-haltigem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. RNA wurde aus den Zellen isoliert, cDNA hergestellt und die Expression der oben genannten Gene mittels *real-time*-PCR überprüft. Die Genaktivierung wurde auf die jeweiligen Werte der *gapdh*-Messung normiert. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

4. Diskussion

4.1 Die Linker-Domäne von STAT1 ist an der Transkription und der Dephosphorylierung beteiligt

Alle STAT-Proteine sind aus sechs unterschiedlichen Domänen aufgebaut, deren Funktionen zum Teil schon recht gut untersucht sind; am wenigsten verstanden ist dabei wohl jedoch die Rolle der Linker-Domäne. Durch Sequenzvergleich lässt sich feststellen, dass die Linker-Domäne vergleichsweise gut zwischen den einzelnen Mitgliedern der STAT-Familie konserviert ist. Vielfach wurde angenommen, dass diese Domäne eine flexible Verbindung zwischen der aminoterminal lokalisierten DNA-Bindedomäne und der carboxyterminal davon gelegenen SH2-Domäne darstellt. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Mutageneseansatz gewählt und einzelne Substitutionsmutanten der Linker-Domäne von STAT1 biochemisch charakterisiert, um die Rolle dieser Domäne im Kontext der Zytokin-vermittelten Signaltransduktion besser zu verstehen. Durch diese Experimente ergaben sich neue, bislang nicht bekannte Funktionen zur Bedeutung der Linker-Domäne.

Aus der Literatur sind lediglich zwei Arbeiten von Yang und Kollegen bekannt, die sich mit mehreren Mutanten der Linker-Domäne beschäftigten. Der Großteil unseres Verständnisses zu dieser Domäne entstammt der Charakterisierung des Phänotyps der Doppelmutante KE544-545AA. Die Autoren beschreiben für diese Doppelmutante eine normale Phosphorylierung, Kernakkumulation und DNA-Bindung. Die Zielgenaktivierung nach IFN γ -Stimulation ist jedoch vermindert, während die IFN α -Antwort nach Angaben von Yang und Mitarbeitern dagegen nicht beeinträchtigt ist. In einer ersten Veröffentlichung wurde deshalb zunächst angenommen, dass KE544-545AA und damit auch die Linker-Domäne eine Kontaktfläche für Homodimere mit dem basalen Transkriptionsapparat darstellt (Yang et al., 1999). Durch weitere Versuche konnte zudem festgestellt werden, dass KE544-545AA eine erhöhte Dissoziationsrate von DNA besitzt und die Linker-Domäne somit an der DNA-Bindung beteiligt ist (Yang et al., 2002). Im Zuge dieser Charakterisierung wurden weitere Mutanten der Linker-Domäne untersucht, darunter auch drei Mutanten (F506A, R512A, W555A), die nach IFN γ -Stimulation im Reporter-gen-Assay eine erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu STAT1-WT aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Sequenzvergleich zwei hoch konservierte Reste der Linker-Domäne in den Positionen 500 und 525 identifiziert und nach Alanin mutiert. In einer ersten Untersuchung der transkriptionellen Aktivität mit Hilfe von Reportergenkonstrukten zeigte sich, dass STAT1-E500A nach IFN γ -Stimulation eine erhöhte transkriptionelle Aktivität besitzt, unabhängig davon, ob ein synthetischer oder nativer Promotor verwendet wurde (**Abb. 3.21**). Interessanterweise zeigten Genexpressionsuntersuchungen von endogenen Zielgenen *in vivo* ebenfalls eine gegenüber dem Wildtyp-Molekül erhöhte transkriptionelle Aktivität durch STAT1-E500A nach Exposition der Zellen mit IFN γ , insgesamt also eine stärkere Antwort auf IFN γ als bei STAT1-WT (**Abb. 3.23(A)**).

In der Literatur sind bisher keine STAT1-Mutanten, außer die oben genannten, beschrieben worden, die mit einer hyperphysiologischen Aktivierung von IFN γ -regulierten Genen assoziiert sind. Der Phänotyp von F506A, R512A und W555A wurde jedoch von der Arbeitsgruppe um Darnell nicht weiter untersucht, so dass es keine Erklärung für die veränderte transkriptionelle Aktivität dieser Mutanten gibt. Eine STAT1-Mutante mit einer verbesserten transkriptionellen Leistung kann jedoch von großem Interesse für die Forschung sein, z.B. um Zytokine oder neue Wirkstoffe zur Immunregulation und -suppression effektiv zu testen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie weitere Untersuchungen zur Klärung des Phänotyps der E500A-Mutante durchgeführt.

Die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A wurde ausschließlich nach Stimulation mit IFN γ beobachtet. Die Stimulation mit einem Typ-II-Interferon führt bekanntlich zur Ausbildung von STAT1-Homodimeren. Stimuliert man hingegen mit IFN α wird die Bildung eines trimeren Komplexes von STAT1-STAT2-Heterodimeren mit koassoziertem p48 induziert. Die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von STAT1-E500A nach Stimulation mit einem Typ-I-Interferon, nämlich IFN α , ergab, dass die Expression von IFN α -Zielgenen nicht verbessert, sondern stattdessen sogar etwas vermindert ist (**Abb. 3.23(B)**).

Zusätzlich wurde die konstitutive Genexpression von STAT1-E500A auf Zytokin-unabhängige Caspasegene untersucht (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Caspasegene werden während der Apoptose aktiviert und exekutieren den programmierten Zelltod. STAT1-defiziente Zellen zeigen keine Apoptose nach Gabe von TNF α (Tumornekrosefaktor α) und die basale Expression der Caspasen 1, 2 und 3 ist

gering. Interessanterweise führt die Transfektion von STAT1-defizienten U3A-Zellen mit STAT1 α zur Induktion von apoptoseinduzierenden Genen in diesen Zellen. Auch die Einführung von Punktmutationen in die SH2-Domäne und die Substitution des essentiellen Tyrosinrests in Position 701 führen in STAT1-exprimierenden U3A-Zellen zur Auslösung der Apoptose, wogegen die Abwesenheit von STAT1 oder eine Mutation von Serin 727 die Apoptoseinduktion inhibiert (Kumar et al., 1997). Das bedeutet, dass die Aktivierung von Caspasegenen von STAT1 unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung und Homodimerisierung ist, was für die vorgestellte Punktmutante in der Linker-Domäne ebenfalls zutrifft. Dieses Modell einer Genregulation durch unphosphorylierte, monomere STAT1-Moleküle wurde eingehend anhand des Promotors des LMP2-Gens (*low molecular mass polypeptide 2*) untersucht. Für die Transkription von LMP2 ist ein Komplex aus unphosphoryliertem STAT1 und IRF-1 verantwortlich, der an die teilweise überlappende Interferon-Konsensussequenz 2 (ICS-2) und eine GAS-Stelle im LMP2-Promotor bindet (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

Die Untersuchung der konstitutiven Genaktivierung von STAT1-E500A zeigte, ebenso wie die der Genexpression nach IFN α -Stimulation, keine Verbesserung der transkriptionellen Aktivität (**Abb. 3.24**). Eine gegenüber dem unmutierten Protein verbesserte Genaktivierung konnte demnach nur durch Homodimerisierung im Gefolge einer Stimulation der Zellen mit IFN γ beobachtet werden. Bei KE544-545AA führt die Stimulation mit IFN γ zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität. Die IFN α -Antwort ist hingegen nicht verändert. Allerdings besitzt KE544-545AA eine erhöhte Dissoziationsrate von DNA, durch den sich dieser Phänotyp erklären lässt. Weitere Untersuchungen von STAT1-E500A hinsichtlich der Phosphorylierung, Kinetik der Kernakkumulation, DNA-Bindung und Dissoziationsrate von DNA ergaben keinen Unterschied im Vergleich zu STAT1-WT.

Im Jahr 1998 konnten die Kristallstrukturen von DNA-gebundenem STAT1 (Chen et al., 1998) und STAT3 (Becker et al., 1998) gelöst werden; seitdem weiß man, dass die Dimerisierung von STAT-Proteinen über ihre SH2-Domänen vermittelt wird. Verantwortlich dafür sind mehrere konservierte Aminosäurereste im STAT-Molekül. Wie man durch Mutationsexperimente feststellen konnte, ist der Aminosäurerest in Position 602 essentiell für die Dimerisierung von STAT1. Mutiert man den Argininrest 602 nach Lysin ist STAT1 nicht mehr in der Lage zu dimerisieren (Shuai et al., 1994; Chen et al., 1998). Für die Dimerisierung ist eine strukturelle Umorientierung der

beiden SH2-Domänen notwendig, damit der Argininrest in Position 602 des einen Monomers den Tyrosinrest in Position 701 des anderen Monomers kontaktiert. An der Stabilisierung dieses Übergangs ist die α -Helix 10 der Linker-Domäne beteiligt. In dieser Helix sind auch die Reste W555 und W557 positioniert. Dabei bindet W555 an Segment 4 der DNA-Bindedomäne und W557 an die Phosphat-bindende Schleife (Chen et al., 1998). Wie man **Abb. 4.1** entnehmen kann, liegt der Glutamatrest in Position 500 auf einer anderen Helix der Linker-Domäne als W555 und W557 und hat demnach keinen Einfluss auf diese Stabilisierung und die Homodimerisierung. Die begünstigte Bildung von STAT1-Homodimeren durch die Mutation in Position 500 kann somit als mögliche Erklärung für die verbesserte transkriptionelle Aktivität nach IFN γ -Stimulation ausgeschlossen werden.

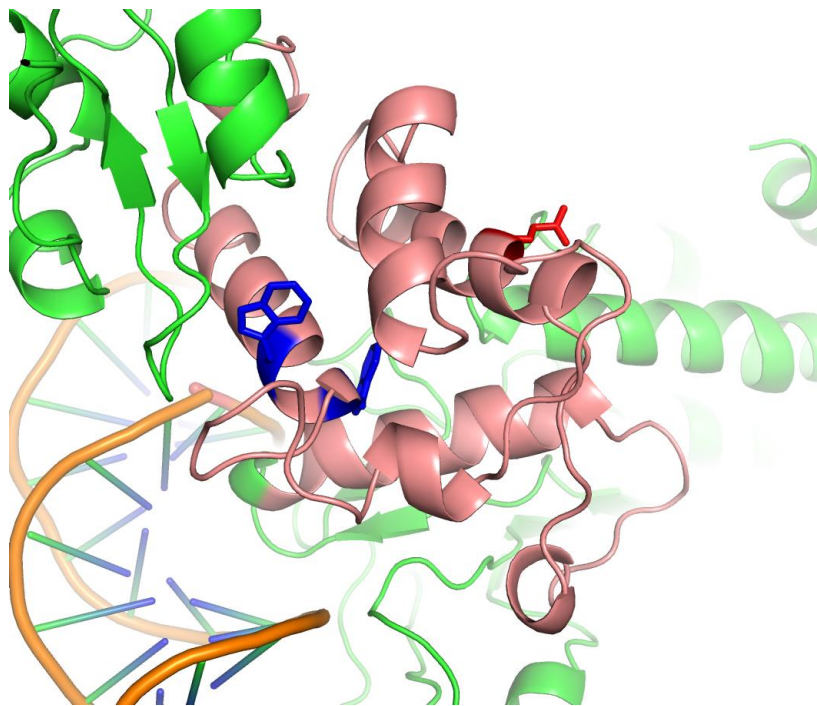


Abb. 4.1: Kristallstruktur der Linker-Domäne von STAT1 mit E500, W555 und W557. Ausschnitt aus der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1. Die LD ist in lachs, E500 in rot, W555 und W557 sind in blau dargestellt.

Eine andere Möglichkeit für die verbesserte transkriptionelle Aktivität von STAT1-E500A nach IFN γ -Stimulation könnte die Rekrutierung von Koaktivatoren des Transkriptionsapparates sein. Die Vermutung, dass die Linker-Domäne von STAT1 als Homodimer Interaktionsflächen mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie liefert, wurde von Yang und Kollegen in einer ersten Veröffentlichung

bereits 1999 postuliert, aber drei Jahre später nach Klärung des Phänotyps von KE544-545AA als DNA-Bindemutante wieder relativiert. In dieser ersten Veröffentlichung von Yang et al. wurden zwei Mutanten von STAT1 präsentiert (F506A und W512A), die im Reporter-gen-Assay eine verbesserte transkriptionelle Aktivität aufwiesen. Diese beiden Mutanten befinden sich genau wie E500 auf der gleichen Helix der Linker-Domäne (**Abb. 4.2**). Diese Helix befindet sich an der Oberfläche von STAT1 und könnte demnach als Interaktionsfläche für Koaktivatoren fungieren. Da der kritische Aminosäurerest in Position 500 eine sauer reagierende, endständige Carboxylatgruppe enthält, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine Substitution mit Alanin eine auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende Abstoßung mit einem Interaktionspartner minimiert wird, und damit Einfluss auf die Genexpression nimmt.

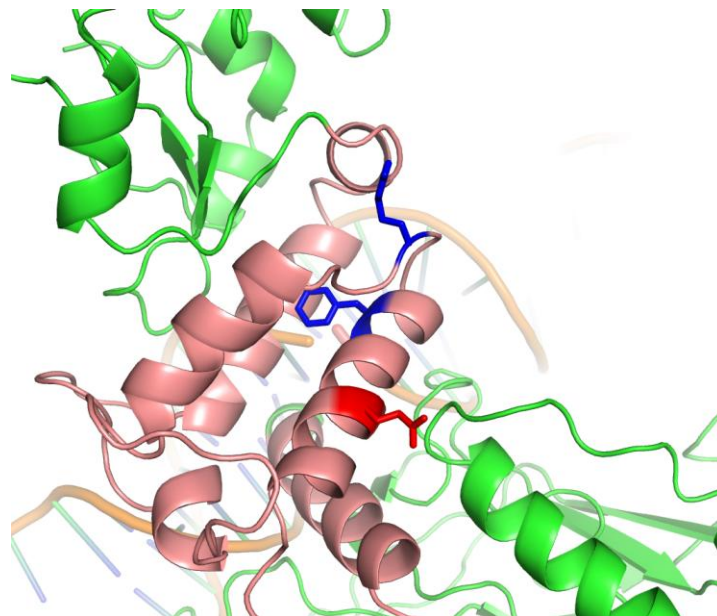


Abb. 4.2: Kristallstruktur der Linker-Domäne von STAT1 mit E500, F506 und W512. Ausschnitt aus der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1. Die LD ist in lachs, E500 in rot, F506 und R512 sind in blau dargestellt.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass STAT1 an transkriptionelle Koaktivatoren wie CBP, p300, pCIP, MCM5, Nmi und BRCA1 bindet (Zhang et al., 1996, 1998; Korzus et al., 1998; Zhu et al., 1999; Ouchi et al., 2000). Durch diese Rekrutierung von Koaktivatoren und Proteinen findet eine positive Regulation der transkriptionellen Aktivität von STAT1 statt (Ramana et al., 2000). So führt z.B. die Zugabe von CBP (cAMP-responsives-Element-bindendes Protein) zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität im Reporter-gen-Assay. Dabei besitzt STAT1 zwei

Kontaktregionen mit CBP, die eine befindet sich in der aminoterminalen Domäne, die andere im carboxyterminalen Molekülbereich (Zhang et al., 1996). Für die Rekrutierung von MCM5 und BRCA1 ist ebenfalls die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne verantwortlich (Zhang et al., 1998; Ouchi et al., 2000; Shuai, 2000). Der N-Myc-Interaktor (Nmi) hingegen interagiert mit der Coiled-coil-Domäne (Zhu et al., 1999). Interaktionspartner mit der Linker-Domäne sind bisher nicht beschrieben worden, jedoch konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass Mutationen in der Linker-Domäne einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität besitzen (Yang et al., 2002).

In humanen Zellen gibt es mehrere Signalwege, die unter strukturellen Aspekten dem Jak-STAT-Signalweg ähneln. Einer dieser Signalwege nimmt seinen Ausgang von Mitgliedern der Familie des transformierenden Wachstumsfaktors- β (TGF- β). Der TGF- β -Signalweg ist an vielen zellulären Prozessen, wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Hämatopoese, beteiligt. Fehlregulationen dieses Signalwegs können zu Krebs und anderen schweren Krankheiten führen (Attisano und Wrana, 2002). In diesem Signalweg gibt es analog zum Jak-STAT-Weg Komponenten der Signaltransduktion, die die externen Signale direkt von der Zytoplasmamembran bis in den Zellkern weiterleiten, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken. Bezüglich der Designprinzipien des Signalweges bestehen damit gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Jak-STAT-Weg, denn auch hier verbinden Mitglieder einer Proteinfamilie, in diesem Fall der Smad-Transkriptionsfaktoren, als Signaltransduktoren die beiden Kompartimente von Cytosol und Nukleus über nukleozytoplasmatische Translokation miteinander. Die Aktivierung des Signalweges erfolgt in diesem Fall durch Bindung eines Liganden der TGF- β -Familie an seinen Typ-II-Rezeptor, dieser rekrutiert den zugehörigen Typ-I-Rezeptor und phosphoryliert ihn. Der Typ-I-Rezeptor wiederum phosphoryliert Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads). Nach der Phosphorylierung kommt es zu einer Homo-Oligomerisierung von Smad2 und -3 oder zu einer Hetero-Oligomerisierung der R-Smads mit Smad4 (coSmad). Der R-Smad/coSmad-Komplex wird in den Zellkern transportiert, wo er an Kofaktoren und Promotoren bindet und die Transkription startet (Shi und Massague, 2003).

Der Aufbau der Smads unterscheidet sich von dem der STAT-Proteine. Smads bestehen lediglich aus zwei hochkonservierten Domänen, der MH1- (MAD homology 1) und MH2-Domäne. Diese beiden Domänen sind durch eine nicht konservierte Linker-Domäne verbunden. Lange Zeit wurde angenommen, dass die

einzigste Funktion der Linker-Domäne in der flexiblen Bewegung von MH1 und MH2 besteht. Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen für MAP-Kinasen, Cyclin-abhängigen Kinasen und Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase II in der Linker-Region von R-Smads zeigten, dass die Linker-Domäne für die Regulation der Smads durch Wechselwirkung mit anderen Signalwegen wichtig ist (Massague, 2003; Shi und Massague, 2003; Liu, 2006). Des Weiteren wurde am C-terminalen Ende der Linker-Domäne von Smad3 und Smad4 eine Transaktivierungsdomäne identifiziert (Wang et al., 2005).

Mutationsexperimente der Linker-Domäne führten zur Identifizierung eines nicht konservierten Asparaginrests in Position 218 von Smad3, deren Substitution zu Alanin, ähnlich wie bei STAT1-E500A, zu einer verbesserten transkriptionellen Aktivität führt (Vasilaki et al., 2009). Die Phosphorylierung und Kernakkumulation von Smad3-N218A unterscheiden sich jedoch nicht im Vergleich zu Smad3-WT. Zusätzlich konnte durch weitere Mutationsexperimente gezeigt werden, dass die Linker-Domäne von Smad3 an der DNA-Bindung beteiligt ist (Vasilaki et al., 2009). Die mögliche Erklärung für die verbesserte transkriptionelle Aktivität von Smad3-N218A ist, wie in dieser Arbeit für STAT1-E500A diskutiert, eine bessere Rekrutierung von Koaktivatoren im Nukleus (Vasilaki et al., 2009).

Die zweite Mutante der Linker-Domäne (STAT1-K525A), die in dieser Arbeit eingehend untersucht wurde, zeigte nach Stimulation der Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ ein vermindertes Phosphorylierungsniveau (**Abb. 3.2**). Eine Tyrosin-Phosphorylierung ist bekanntlich Voraussetzung für die induzierbare Kernakkumulation, eine Bindung an GAS-Stellen sowie die beobachtbare Zytokin-responsive Zielgenaktivierung. Im unstimulierten Zustand weist STAT1 eine weitgehend panzelluläre Verteilung auf, nach Zytokinstimulation befindet sich der größte Teil von STAT1 retiniert im Zellkern. Dort kann es als paralleles Dimer an DNA binden und STAT1-regulierte Zielgene aktivieren. Ist die Phosphorylierung vermindert, wie bei STAT1-K525A, führt dies zu einer verminderten nukleären Retention (**Abb. 3.3**). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass das Ausmaß der DNA-Bindung aufgrund des verringerten Phosphorylierungslevels der Mutante vermindert ist, nicht aber aufgrund eines strukturellen Effektes die Affinität zu GAS-Bindestellen prinzipiell kompromittiert ist (**Abb. 3.5**). Die reduzierte intrazelluläre Konzentration von Phospho-STAT1 und konsekutiv verminderte Bindung an GAS-Stellen führt wiederum zu einer verringerten Zielgenaktivierung, wie im Reporter-gen-Assay und *in vivo* mittels *real-time*-PCR

gezeigt werden konnte (**Abb. 3.9, 3.10 und Abb. 3.11**). Die verminderte Kernakkumulation und DNA-Bindung sowie die supprimierte Genexpression nach Stimulation der Zellen mit IFN γ werden bei STAT1-K525A demnach als notwendige Folgen angesehen, die sich aus der verringerten Phosphorylierungsrate von STAT1-K525A im Vergleich zu STAT1-WT ergeben.

Die Freisetzung von Interferonen und die damit verbundene Rezeptoraktivierung induziert eine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1, wobei die Zytokine mit spezifischen membranständigen Rezeptoren wechselwirken müssen (Darnell, 1997). Eine Stimulation von Zellen mit IFN γ führt zur Bindung und Dimerisierung des IFNGR (Interferon-gamma-Rezeptor), während im Verlauf einer Stimulation mit IFN α zwei Untereinheiten des IFNAR (Interferon-alpha-Rezeptor) dimerisieren. Beide Rezeptoren besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität, anders als der EGF-Rezeptor, und bedürfen deshalb nicht-kovalent assoziierter Proteine, die über Kinaseaktivität verfügen, wie die Janus-Kinasen (Bach et al., 1997). Demnach könnte die verminderte Phosphorylierung der Linker-Domänenmutante selektiv nur nach Stimulation der Zellen mit bestimmten Zytokinen auftreten. Für STAT1-K525A konnte jedoch in eigenen Versuchen gezeigt werden, dass die Stimulation mit IFN γ (**Abb. 3.2**), IFN α (**Abb. 3.12 (A)**) und EGF (**Abb. 3.12 (B)**) gleichermaßen zu einem, verglichen mit STAT1-WT, supprimierten Phosphorylierungsniveau führt. Die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K525A ist somit unabhängig vom Stimulationsmodus und betrifft alle hier untersuchten Signalwege unabhängig vom eingesetzten Liganden von STAT1.

Eine andere Möglichkeit, die einen Einfluss auf die Phosphorylierung haben kann, ist die Phosphorylierung durch Jak-Kinasen. Wie bereits erwähnt, besitzen IFNAR und IFNGR keine intrinsische Kinaseaktivität. Der EGFR hat jedoch intrinsische Kinaseaktivität, allerdings kann die Aktivierung auch unter Beteiligung von Jak1/2 ablaufen. Ist die Tyrosin-Phosphorylierung durch Jak1/2 gehemmt, führt dies zu einem verminderten Phosphorylierungsniveau. Des Weiteren könnte auch die Rezeptorbindung von STAT1-K525A kompromittiert sein. Für die Phosphorylierung von STAT1 ist eine Bindung an den Zytokinrezeptor über die STAT-eigene SH2-Domäne notwendig, da nur dann der kritische Tyrosinrest in Position 701 in die Nähe der Jak-Kinasen gelangt und eine Phosphatgruppe eingebaut werden kann. Die SH2-Domäne ist zusätzlich für die Dimerisierung von STAT1 verantwortlich. Mutiert man den für die Dimerisierung wichtigen Argininrest in Position 602 kann STAT1 keine

Dimere bilden und wird nicht phosphoryliert (Shuai et al., 1993b; Chen et al., 1998). Eine funktionelle SH2-Domäne ist demnach essentiell für die Rezeptorbindung und die Phosphorylierung. Anhand von eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass STAT1-K525A funktionelle Dimere bilden kann (**Abb. 3.15**) und auch die Phosphorylierung durch aktive Jak2-Kinasen möglich ist (**Abb. 3.13**).

Eine interessante Beobachtung für STAT1-K525A ist, dass sich die verminderte Phosphorylierung durch Vanadat-Zugabe kompensieren lässt (**Abb. 3.16**). Auch die kompromittierte DNA-Bindung ist nach Vanadat-Zugabe nicht mehr nachweisbar und STAT1-K525A akkumuliert normal in den Nuklei stimulierter Zellen (**Abb. 3.18** und **3.17**). Bei Vanadat handelt es sich um einen Inhibitor der Tyrosin-Phosphatasen (Huyer et al., 1997). Wird die Dephosphorylierung durch Phosphatasen pharmakologisch inhibiert, lässt sich eine Hyperphosphorylierung von STAT1 induzieren. Da sich STAT1-K525A in der Gegenwart von Vanadat uneingeschränkt phosphorylieren lässt, kann ein Phosphorylierungsdefekt als Ursache des beobachteten Phänotyps dieser Mutante ausgeschlossen werden. Mittels *in vitro* und *in vivo* Dephosphorylierungsexperimenten ließ sich stattdessen zeigen, dass es sich bei STAT1-K525A um eine Dephosphorylierungsmutante handelt. Behandelt man STAT1-K525A-exprimierende, IFN γ -prästimulierte Zellen *in vivo* mit Staurosporin, einem Kinaseinhibitor, lässt sich eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zu STAT1-WT beobachten (**Abb. 3.19 (A)**). Auch durch *in vitro* Inkubation mit aktiver Phosphatase (TC-PTP) ließ sich zeigen, dass STAT1-K525A im Vergleich zu STAT1-WT viel schneller dephosphoryliert wird (**Abb. 3.19 (B)**). Bereits 15 min nach Zugabe von TC-PTP sind nur noch geringe Mengen an Phospho-STAT1-K525A in den Reaktionsansätzen detektierbar.

Wie durch Kristallisationsexperimente gezeigt werden konnte, gibt es für STAT1 zwei unterschiedliche Konformationen. Eine parallele Konformation, bei dieser zeigen die SH2-Domänen in die gleiche Richtung, und eine antiparallele, bei der die SH2-Domänen in unterschiedliche Richtungen orientiert sind (Chen et al., 1998; Mao et al., 2005). Durch die Phosphorylierung des kritischen Tyrosinrests bildet sich die parallele Dimerform von STAT1, die im Zellkern akkumuliert und an DNA binden kann. Für die Rekrutierung der Phosphatase muss STAT1 die antiparallele Konformation einnehmen, ansonsten verbleibt STAT1 in der phosphorylierten Form (Zhong et al., 2005; Mertens et al., 2006). Wie man durch Substitutions- und Deletionsexperimente herausgefunden hat, sind für die Umlagerung zwischen

paralleler und antiparalleler Konformation die N-Termini verantwortlich (Shuai et al., 1996; Mertens et al., 2006). Die Stabilisierung der antiparallelen Konformation erfolgt über CCD-DBD-Interaktionen, daran sind die Aminosäuren F172 der CCD sowie Q340, L383, G384, T385, H406, L407, Q408 auf Seiten der DBD beteiligt (Mao et al., 2005). Die Mutation nur einer dieser Aminosäuren führt zu einer Destabilisierung der antiparallelen Konformation und dadurch bedingt zu einem Defekt der Dephosphorylierung (Mertens et al., 2006). Die parallele Konformation wird durch reziproke Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen stabilisiert. Wie oben bereits erwähnt, ist für diesen Kontakt eine strukturelle Umorientierung der beiden SH2-Domänen notwendig. An der Stabilisierung dieses Übergangs ist die α -Helix 10 der Linker-Domäne beteiligt. Dabei findet eine Interaktion zwischen der DNA-Bindedomäne mit W555 und der Phosphat-bindenden Schleife mit W557 statt, die beide auf der α -Helix 10 gelegen sind (Chen et al., 1998). Yang und Kollegen führten 2002 Mutations-experimente mit STAT1-W557A durch und beobachteten dabei, dass die Mutation zu Alanin mit einer inhibierten Phosphorylierung und DNA-Bindung einhergeht. Des Weiteren ist die transkriptionelle Aktivität der Mutante vermindert; doch wurden weitere Experimente zur Klärung des Phänotyps von STAT1-W557A in diesem Zusammenhang nicht durchgeführt. Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse mit STAT1-K525A liegt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich bei W557A ebenfalls um eine Dephosphorylierungsmutante handelt. In **Abb. 4.3** sieht man, dass sich K525 und W557 auf zwei unterschiedlichen Helices der Linker-Domäne von STAT1 befinden. Allerdings liegen sich beide Reste in einem Abstand von 3,38 Å gegenüber.

Eine mögliche Erklärung für die stärkere Dephosphorylierung von STAT1-K525A wäre, dass der Lysinrest und die umliegenden Aminosäuren die Affinität der Bindung der Phosphatase an STAT1 kontrollieren. Diese Oberfläche würde sich gemäß dieser Hypothese positiv auf die Höhe des Phosphorylierungssignals auswirken, indem sie die Phosphatase abstoßen würde. Mutiert man Aminosäurereste wie K525 und W557 nach Alanin, ist die Oberfläche der Linker-Domäne in dieser Region alteriert und die Rekrutierung der Phosphatase könnte nicht gehindert sein.

In früheren Arbeiten konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass die DNA-Bindung vor Dephosphorylierung schützt (Meyer et al., 2003; Meyer et al., 2004). Besitzen STAT1-Mutanten eine erhöhte Dissoziationsrate von DNA resultiert dies in einer verstärkten Dephosphorylierung von STAT1, weil der Schutz vor Inaktivierung

DNA-gebundener Dimere weniger effektiv ist. Für STAT1-K525A konnte in eigenen Experimenten jedoch gezeigt werden, dass die Dissoziationsrate vergleichbar mit der von STAT1-WT ist (**Abb. 3.7**).

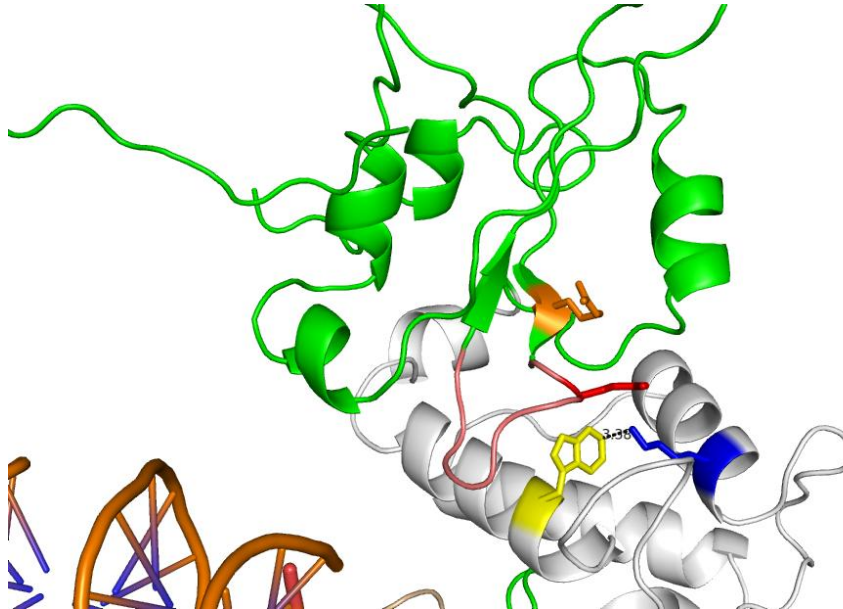


Abb. 4.3: Kristallstruktur von STAT1 mit K525 und W557. Ausschnitt aus der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1. Die LD ist in grau, die Phosphat-bindende Schleife ist in lachs, K525 ist in blau und W557 ist in gelb dargestellt.

Eine weitaus plausible Erklärung für den Phänotyp von STAT1-K525A, und mutmaßlich auch für STAT1-W557A, ist eine mögliche Destabilisierung der parallelen Konformation, die mit Einführung dieser Mutation verbunden ist. Dadurch wäre die Umlagerung von der parallelen zur antiparallelen Konformation favorisiert und die Bindung an die Phosphatase erleichtert. W557 ist nachweislich an der Stabilisierung des Übergangszustandes der SH2-Domänen der parallelen Konformation beteiligt. Fällt die Wechselwirkung mit der Phosphat-bindenden Schleife weg, erfolgt eine Destabilisierung dieses Übergangszustandes und eine erleichterte Umlagerung in die antiparallele Konformation ist die Folge (Chen et al., 1998). In **Abb. 4.3** sieht man, dass auch K525 in die Richtung der Phosphat-bindenden Schleife zeigt, so dass eine Mutation in dieser Position ebenfalls zu einer Destabilisierung führen könnte.

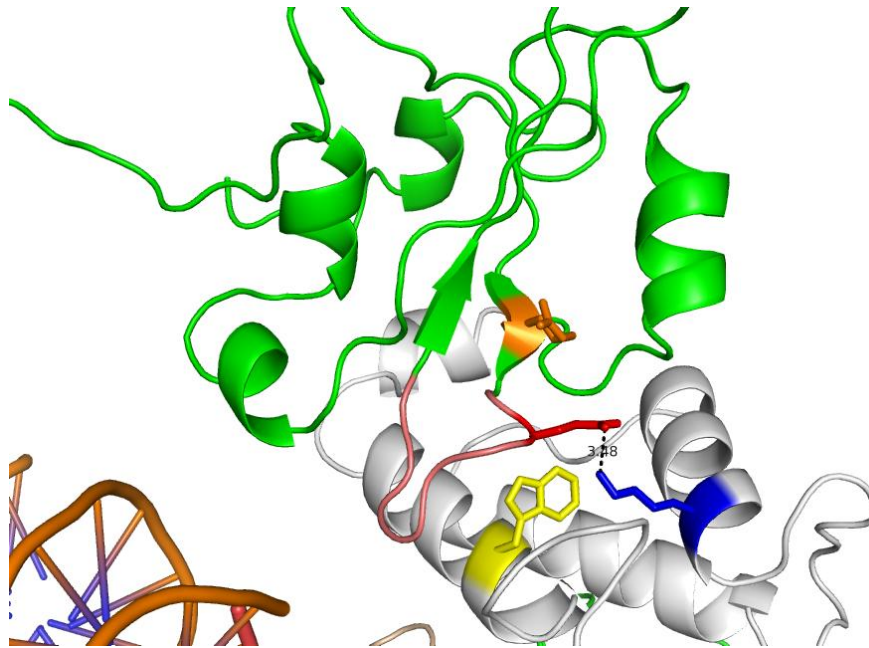


Abb. 4.4 Kristallstruktur von STAT1 mit K525, W557, R602 und E605. Ausschnitt aus der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1. Die LD ist in grau, die Phosphat-bindende Schleife ist in lachs, K525 ist in blau, W557 ist in gelb, R602 ist in orange und E605 ist in rot dargestellt.

Untersucht man die Region um den Lysinrest in Position 525 und der Phosphat-bindenden Schleife mit Hilfe der Kristallstruktur von STAT1 genauer, lässt sich in Position 605 ein Glutamatrest identifizieren. Dieser Glutamatrest ist 3,5 Å von dem Lysinrest in Position 525 entfernt und steht vermutlich durch eine Salzbrücke in direktem Kontakt mit diesem (**Abb. 4.4**). Wie bereits erwähnt, ist für die Ausbildung der parallelen Konformation eine Umorientierung der SH2-Domäne notwendig, da der Phosphotyrosinrest des einen Monomers in Kontakt mit dem Argininrest 602 des anderen Monomers treten muss. Damit diese Wechselwirkung erfolgen kann, muss die Phosphat-bindende Schleife in ihrer Position gehalten werden, damit keine abstoßenden Wechselwirkungen auftreten können. Diese Stabilisierung erfolgt vermutlich durch die Salzbrückenbindung des Glutamatrestes in Position 605 und des Lysinrests in Position 525. Mutiert man den Lysinrest zu Alanin fällt die Salzbrücke mit der endständigen Carboxylatgruppe des Glutamatrestes weg und die Phosphat-bindende Schleife wird nicht mehr in dieser Position gehalten. Dadurch entsteht eine Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Phosphatrest des einen Monomers und der funktionellen Gruppe des Glutamatrestes im kontralateralen Monomer. Insgesamt resultiert daraus eine Destabilisierung der parallelen Dimerkonformation und STAT1 liegt überwiegend in der antiparallelen Konformation vor, was mit einer höheren Dephosphorylierungsrate einhergeht.

Eine weitere Tatsache, die für diese Erklärung spricht, ist, dass das nukleäre Lokalisationssignal, welches für den Import durch Importin 1 notwendig ist, nur in der parallelen Dimerkonformation für Importin zugänglich ist (Zhong et al., 2005). Demnach würde die überwiegend antiparallele Konformation zu einem verminderten Import von Phospho-STAT1 und einer überwiegend cytoplasmatischen Verteilung führen. Dies wurde für STAT1-K525A tatsächlich beobachtet (**Abb. 3.3**).

Die Arbeitsgruppe um Vinkemeier generierte 2004 eine Punktmutante im N-Terminus, die eine Hyperphosphorylierung, eine verbesserte transkriptionelle Aktivität an starken Promotoren und einen Defekt der Dephosphorylierung aufwies. Des Weiteren konnte diese Mutante aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung den Zellkern nicht verlassen. Diese Mutante in Position 77 von STAT1 weist demnach den entgegengesetzten Phänotyp zu STAT1-K525A auf. Zuerst wurde angenommen, dass das Phenylalanin in Position 77 eine Angriffsstelle für die Phosphatase darstellt. Durch Lösen der Kristallstruktur und Deletionsexperimente konnte allerdings gezeigt werden, dass der N-Terminus für den Konformationsshift von der parallelen zur antiparallelen notwendig ist (Shuai et al, 1996; Mao et al., 2005; Mertens et al., 2006); dabei müssen die N-Termini der beiden Monomere miteinander interagieren und die reziproke Phosphotyrosin-SH2-Bindung löst sich. Der Phenylalaninrest in Position 77 ist für die Wechselwirkung der N-Termini verantwortlich, denn eine Mutation dieses Restes nach Alanin führt zu einem Verlust dieser Wechselwirkung, was sich zusätzlich in einem Verlust der kooperativen DNA-Bindung zeigt (Meyer et al., 2004). Fehlt die Wechselwirkung der N-Termini kann kein Konformationsshift stattfinden und Phospho-STAT1 wird mit verminderter Rate durch die Phosphatase dephosphoryliert. Die gehemmte Ausbildung der antiparallelen Konformation ist demnach von einem Dephosphorylierungsdefekt begleitet. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der Verlust der Stabilisierung der parallelen Konformation zu einer erhöhten Dephosphorylierungsrate von STAT1-K525A führt. Die erhöhte Dephosphorylierungsrate konnte durch *In-vivo*-Experimente mit lebenden Zellen und *In-vitro*-Versuche mit der aufgereinigten TC-Phosphatase eindrucksvoll bestätigt werden (**Abb. 3.19**).

4.2 Charakterisierung einer DNA-Bindemutante mit verminderter DNA-Bindung aber erhaltener GAS-Erkennung

In dieser Arbeit wurden Mutationen der Linker-Domäne von STAT1 mit der Maßgabe generiert, mehr über die Funktion dieser bislang wenig untersuchten Domäne zu erfahren. Im Zuge dieser Versuche konnte bestätigt werden, dass die Linker-Domäne essentiellen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von STAT1 besitzt. Es wurde gefunden, dass STAT1 in Position 500 einen konservierten Glutamatrest besitzt, dessen Substitution zu Alanin mit einer Liganden-abhängigen, differentiellen Gentranskription einhergeht. Des Weiteren konnte erstmalig demonstriert werden, dass die Linker-Domäne von STAT1 an der Dephosphorylierung beteiligt ist. Die Mutation eines hochkonservierten Lysinrests in Position 525 führte zu einer verbesserten Dephosphorylierung durch die Tyrosin-Phosphatase und dadurch bedingt zu einem geringeren Phosphorylierungsniveau mit einer überwiegend cytoplasmatischen Lokalisation von STAT1-K525A.

Die Experimente zeigen einmal mehr den essentiellen Einfluss der DNA-Bindung auf die transkriptionelle Aktivität. Strukturell besteht die DNA-Bindedomäne von STAT1 aus 170 Aminosäuren. Durch Kristallisationsexperimente konnte gezeigt werden, dass nur einige wenige Aminosäuren in direktem Kontakt mit der DNA stehen (Chen et al., 1998). Mutationen dieser Aminosäuren führen zu Änderungen in der Affinität zu GAS-Stellen und veränderten Off-Raten von der DNA (Yang et al., 2002; Meyer et al., 2003). Des Weiteren können Mutationen in der Linker-Domäne von STAT1 ebenfalls einen Einfluss auf die DNA-Bindung ausüben (Yang et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde in einem zweiten Versuchsteil eine Punktmutante der DNA-Bindedomäne von STAT1 untersucht (STAT1-F364A), dessen substituierter Aminosäurerest sich außerhalb der Kontaktfläche zur DNA-Doppelhelix befindet und nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligt ist. Dieser kritische Aminosäurerest in Position 364 von STAT1 ist an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert und könnte für die Architektur der DNA-Bindedomäne bedeutsam sein (**Abb. 3.32**). Zum Vergleich wurde eine zweite Substitutionsmutante der DNA-Bindedomäne von STAT1 verwendet, von der aus eigenen Vorversuchen bekannt war, dass sie nach IFN γ -Stimulation der Zellen ein stärkeres Phosphorylierungssignal aufwies. Bei dieser hyperphosphorylierten Mutante handelte es sich um die Substitution eines Threoninrestes in Position 385, der zu Alanin konvertiert wurde. Wie man der Kristallstruktur

von Mao und Kollegen entnehmen kann, befindet sich Threonin 385 in einer Tasche der DBD, die für die Stabilisierung der antiparallelen Konformation durch Bindung von F172 des kontralateralen Monomers verantwortlich ist (Mao et al., 2005).

Mutationsexperimente von F172, Q340, G384 und Q408 hatten bereits gezeigt, dass diese Mutationen zu einer Hyperphosphorylierung führen (Mertens et al., 2006). Des Weiteren weist STAT1-F172W einen Defekt der Dephosphorylierung auf. Der Dephosphorylierungsdefekt und die Hyperphosphorylierung kommen aufgrund der fehlenden Stabilisierung der antiparallelen Konformation durch die Kontaktfläche zwischen DBD und CCD, an der die genannten Aminosäuren beteiligt sind, zustande. Fehlt diese Wechselwirkung kann die antiparallele Konformation von STAT1 nicht mehr eingenommen werden und das Protein bleibt länger und stärker als das Wildtyp-Molekül phosphoryliert, da die Phosphatase wenig effektiv angreifen kann (Zhong et al., 2005). Threonin 385 ist ebenfalls an dieser Wechselwirkung beteiligt, wie die hier vorgestellten, eigenen Ergebnisse zeigen. Eine Mutation zu Alanin führt demnach ebenfalls zu einer Destabilisierung der antiparallelen Konformation, so dass STAT1-T385A weitaus geringer dephosphoryliert wird als das unmutierte STAT1-Dimer. Diese Beobachtung stützt sich auf den experimentell nachweisbaren Dephosphorylierungsdefekt durch *In-vivo*- (**Abb. 3.33**) und *In-vitro*-Versuche und ist mit einer verlängerten Kernakkumulationsphase von Phospho-STAT1-T385A nach IFN γ -Stimulation verbunden (**Abb. 3.36**). STAT1-T385A kann aufgrund der fehlenden Dephosphorylierung nur eingeschränkt aus dem Zellkern transportiert werden. Anhand des Vergleichs mit STAT1-T385A konnte festgestellt werden, dass die neu beschriebene F364A-Mutante demgegenüber keine Hyperphosphorylierung aufweist (**Abb. 3.33**).

Anhand mehrerer unabhängiger Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung wichtig für die Inaktivierung und die Kernakkumulation ist. So führen z.B. Mutationsexperimente in der DNA-Bindedomäne von STAT1 und STAT5b zu einem Verlust der Kernakkumulation (Herrington et al., 1999; Meyer et al., 2003). Meyer et al. generierten 2003 mehrere STAT1-Bindemutanten auf Grundlage der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1. Die mutierten Aminosäuren stehen in Kontakt mit dem Phosphatrückgrat der DNA und liegen außerhalb des NLS, das sich ebenfalls in der DNA-Bindedomäne befindet. Dessen Mutation führt ebenfalls zu einem Verlust der Kernakkumulation von STAT1 (Melen et al., 2001). Die von den Autoren benutzten Mutanten, genannt DNA^{Plus} (T327R, VT426-427HH) und DNA^{Minus}

(VT426-427DD), wurden bezüglich ihrer DNA-Bindung und Kernakkumulation im Vergleich zu einer von Yang et al. (2002) generierten Mutante untersucht, die sie als DNA^{off} (KE544-545AA) bezeichneten. DNA^{off} besitzt eine erhöhte Off-Rate von DNA, erkennt aber palindrome GAS-Stellen. Für DNA^{Plus} konnte gezeigt werden, dass die Mutante nach IFN γ -Stimulation durch unspezifische Bindungen an degenerierten Nicht-GAS-Bindestellen bindet und dadurch eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierungsphase und verlängerte Dauer der Zytokin-induzierten Kernakkumulation aufweist. Dennoch ist diese Mutante nicht in der Lage, STAT1-spezifische Zielgene zu aktivieren. DNA^{Minus} hingegen verliert jegliche Affinität zur DNA-Bindung und akkumuliert daher nicht nennenswert im Kern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei STAT1-F364A ebenfalls um eine DNA-Bindemutante handelt, da sie eine verminderte Affinität zu DNA besitzt (**Abb. 3.39**). Durch Generierung einer F364A-NES-Doppelmutante konnte dieses Ergebnis zusätzlich bestätigt werden (**Abb. 3.42**). Diese Doppelmutante verfügt aufgrund der Präsenz eines NES über einen hyperaktiven Export, so dass diese Proteine nach IFN γ -Stimulation sofort wieder aus dem Zellkern exportiert werden. Hemmt man das für den Export von STAT1 verantwortliche Exportin CRM1 durch Zugabe von Leptomycin B, kommt es aufgrund der verminderten DNA-Bindung im Gegensatz zu STAT1-WT zu keiner Retention von STAT1-F364A im Zellkern von Zytokin-stimulierten Zellen. Eine verstärkte Dephosphorylierung von STAT1-F364A konnte jedoch durch *In-vivo*- und *In-vitro*-Dephosphorylierungsexperimente ausgeschlossen werden (**Abb. 3.33** und **3.34**). Die aus der Literatur bekannte STAT1-Mutante DNA^{off} zeigt ebenfalls eine niedrig affine DNA-Bindung, die jedoch aufgrund einer erhöhten Off-Rate von DNA zustande kommt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente legen nahe, dass STAT1-F364A die gleiche Off-Rate wie STAT1-WT aufweist (**Abb. 3.40**).

Anders als bei STAT1-DNA^{minus} führt die niedrig affine DNA-Bindung von STAT1-F364A zu keinem Verlust der Zytokin-induzierbaren Kernakkumulation. Erst im Kontext der NES-Additionsmutante zeigt sich bei STAT1-F364A eine verminderte Retention im Kern von Interferon-stimulierten Zellen. Mittels Fluoreszenzuntersuchungen von STAT1-F364A-GFP-Fusionsproteinen konnte allerdings demonstriert werden, dass die Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT und STAT1-F364A in etwa vergleichbar ist. Die verminderte DNA-Bindung führt demnach in diesem Fall zu keinem Verlust der Kernakkumulation von STAT1-F364A, wie es für

andere DNA-Bindemutanten der Fall ist. Der Grund dafür liegt möglicherweise darin, dass STAT1-F364A trotz der verminderten DNA-Bindung immer noch eine ausreichende Affinität zur DNA besitzt (**Abb. 3.39**), die eine Retention im Zellkern von Zytokin-stimulierten Zellen ermöglicht. Aufgrund der noch vorhandenen GAS-Erkennung ist der Einfluss der verminderten DNA-Bindung auf die transkriptionelle Aktivität von STAT1-F364A partiell kompensiert. STAT1-F364A besitzt zwar eine verminderte transkriptionelle Aktivität an artifiziellen Reportergenkonstrukten, allerdings ist dieser Einfluss auf die Regulation nativer, IFN-responsiver Zielgene bemerkenswert gering (**Abb. 3.43, 3.44 und Abb. 3.45**).

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Linker-Domäne von STAT1 an der differentiellen Zielgenerkennung und der Regulation der Dephosphorylierung beteiligt ist. Es wurde ein Glutamatrest in Position 500 der LD identifiziert, dessen Mutation zu Alanin zu einer verbesserten transkriptionellen Aktivität nach IFN γ -Stimulation führt. Die IFN α -abhängige Genaktivierung dieser Substitutionsmutante ist jedoch partiell supprimiert. Damit stellt die E500A-Mutante ein interessantes Werkzeug für die Erforschung der Wirkungsweise von Interferonen dar. Die an der Moleküloberfläche exponierte Helix könnte sich überdies als ein möglicher Angriffspunkt von Pharmaka erweisen, mit denen sich die intrazellulären Effekte von Zytokinen modulieren lassen. Des Weiteren wäre es sinnvoll, mit dieser Mutante ein transgenes Mausmodell zu generieren, um den Einfluss einer differentiellen, Liganden-abhängigen Genexpression im organismischen Kontext einer grundlegenden experimentellen Untersuchung zu unterziehen. Durch Herstellung einer STAT1-E500A-knockin-Maus hätte man vermutlich die Möglichkeit, den Einfluss der STAT1-vermittelten Genexpression bei bakteriellen und viralen Infekten zu untersuchen. Es wird erwartet, dass homozygote STAT1^{E500A/E500A}-Mäuse eine verminderte Letalität nach Inokulation mit *Listeria monocytogenes* aufweisen, aber eine erhöhte Suszeptibilität für virale Pathogene besitzen. Eine solche Hypothese bedarf freilich einer systematischen immunologischen Überprüfung, doch dafür würde sich die STAT1-E500A-knockin-Maus in idealer Weise für die Untersuchung einer differentiellen Interferon-responsiven Genexpression anbieten.

Literatur

Alonzi, T. D. Maritano, B. Gorgoni, G. Rizzuto, C. Libert, V. Poli (2001). Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene activation in the liver. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1621-1632.

Attisano, L., J.L. Wrana (2002). Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* **296**, 1646-1647.

Bach E.A., M. Aguet, R.D. Schreiber (1997). The IFN receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563-591.

Baden HA, S.P. Sarma, R.B. Kapust, R.A. Byrd, D.S. Waugh (1998). The amino-terminal domain of human STAT4. Overproduction, purification, and biophysical characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 17109-14.

Barillas-Mury, C., Y.-S. Han, D. Seeley, F.C. Kafatos (1999). *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* **18**, 959-967.

Becker, S., B. Groner, C.W. Müller (1998). Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* **394**, 145-151.

Begitt, A., T. Meyer, M. van Rossum, U. Vinkemeier (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10418-10423.

Blume-Jensen, P., T. Hunter (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.

Bluyssen, H.A. und D.E. Levy (1997). Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence specific contacts provided by Stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 4600-4605.

Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, J.C. Howard (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749-795.

Bogdan, S., C. Klämbt (2001). Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr. Biol.* **11**, R292-295.

Braunstein, J., S. Brutsaert, R. Olson, C. Schindler (2003). STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 34133-34140.

Bromberg J, J.E. Darnell (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-2473.

Callard, R., A. Gearing (1994). The Cytokine facts book. *Academic Press, San Diego*.

Chang, C.-H., J. Hammer, J.E. Loh, W.L. Fodor, R.A. Flavell (1992). The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* **35**, 378-384.

Chatterjee-Kishore, M., K.L. Wright, J. Ting, G.R. Stark (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* **19**, 4111-4122.

Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J.E. Darnell, J. Kuriyan. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **93**, 827-839.

Chen X, R. Bhandari, U. Vinkemeier, F. Van Den Akker, J.E. Darnell, J. Kuriyan (2003). A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci.* **12**, 361-5.

Cohen, S.N., A.C. Chang, L. Hsu (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.

Conti, E., E. Izaurralde (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Current Opinion Cell Biol.* **13**, 310–319.

Copeland, N.G., D.J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J.E. Darnell, Jr., A.L. Mui, A. Miyajima, F.W. Quelle, J.I. Ihle, N.A. Jenkins (1995). Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* **29**, 225-228.

Darnell, J.E., I.M. Kerr, G.R. Stark (1994). Jak-STAT Pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.

Darnell, J.E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635.

Decker, T., P. Kovarik (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.

Durbin, J., R. Hackenmiller, M.C. Simon, D.E. Levy (1996). Targeted disruption of the mouse *Stat1* gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 441-450.

Fagerlund, R., K. Melen, L. Kinnunen, I. Julkunen (2002). Arginine/Lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and Importin $\alpha 5$. *J. Biol. Chem.* **277**, 30072-30078.

Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, I.W. Mattaj (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060.

Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea, S. Koyasu (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: Mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22**, 556-560.

Fu, X., C. Schindler, T. Improta, R. Aebersold, J.E. Darnell, Jr. (1992). The proteins of ISGF-3, the interferon α -induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7840-7843.

Görlich, D., U. Kutay (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607-660.

Haspel, R.L., M. Salditt-Georgieff, J.E. Darnell Jr. (1996). The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J.* **15**, 6262-6268.

Haspel, R.L., J.E. Darnell, Jr. (1999). A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10188-10193.

Herrington, J., L. Rui, G. Luo, L. Yu-Lee, C. Carter-Su (1999). A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5b. *J. Biol. Chem.* **274**, 5138-5145.

ten Hoeve, J., M. Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, K. Shuai (2002). Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5662-5668.

Horvath, C. M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 496-502.

Hou, J., V. Baichwal, Z. Cao (1994). Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11641-11645.

Huyer, G., S. Liu, J. Kelly, J. Moffat, P. Payette, B. Kennedy, G. Tsaprailis, M.J. Gresser, C. Ramachandran (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine Phosphatase by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* **272**, 843-851.

Jacoby, J.J., A. Kalinowski, M-G. Liu, S. Zhang, Q. Gao, G. Chai, L. Ji, Y. Iwamoto, E. Li, M. Schneider, K. Russell, X. Fu (2003). Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12929-12934.

John S, U. Vinkemeier, E. Soldaini, J.E. Darnell, W.J. Leonard (1999). The significance of tetramerization in promoter recruitment by STAT 5. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 1910-1918.

Kalab P., K. Weis, R. Heald (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* **295**, 2452-6.

Kaplan, M.H., U. Schindler, S.T. Smiley, M.J. Grusby (1996a). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313-319.

Kaplan, M.H., Y.L. Sun, T. Hoey, M.J. Grusby (1996b). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**, 174-177.

Kawata. T., A. Shevchenko, M. Fukuzawa, K.A. Jermyn, N.F. Totty, N.V. Zhukovskaya, A.E. Sterling, M. Mann, J.G. Williams (1997). SH2 Signaling in a lower eukaryote: A STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell* **89**, 909-916.

Körner, C., T. Guan, L. Gerace, G. Cingolani (2003). Synergy of silent and hot spot mutations in importin β reveals a dynamic mechanism for recognition of a nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **278**, 16216-16221.

Köster, M., H. Hauser. (1999). Dynamic redistribution of STAT1 protein in IFN signalling visualized by GFP fusion proteins. *Eur. J. Biochem.* **260**, 137-144.

Korzus, E., J. Torchia, D.W. Rose, L. Xu, R. Kurokawa, E.M. McInerney, T.M. Mullen, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* **279**, 703-707.

Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E.P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, S. Horinouchi (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9112-9117.

Kumar, A., M. Commane, T. W. Flickinger, C.M. Horvath, G.R. Stark (1997). Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* **278**, 1630-1632.

Kypta, R. M., A. Hemming, SA Courtneidge (1988). Identification and characterization of p59^{l^{yn}} (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* **12**, 3837-3844.

Langer, J.A., S. Pestka (1988). Interferon receptors. *Immunol. Today* **9**, 393-400.

Leaman, D.W., S. Pisharody, T. Flickinger, M.A. Commane, J. Schlessinger, I.M. Kerr, D.E. Levy, G.R. Stark (1996). Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos Gene expression by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 369-375.

Leung, S., X. Li, G.R. Stark (1996). STATs find that hanging together can be stimulating. *Science* **273**, 750-751.

Levy, D.E., J.E. Darnell, Jr. (2002). STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 651-662.

Lim, C.P., X. Cao (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol. Biosyst.* **2**, 536-550.

Litterst, C. M., E. Pfitzner (2001). Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 45713-45721.

Liu, F. (2006). Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 9-17.

Liu, X., G.W. Robinson, K.U. Wagner, L. Garrett, A. Wynshaw-Boris, L. Henninghausen (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* **11**, 179-186.

Liu, X., A.M. Quinn, Y.E. Chin, X. Fu, G. Ruvkun, O. Hobert (1999). STAT genes found in *C. elegans*. *Science* **285**, 167.

Lödige, I., A. Marg, B. Wiesner, B. Malecova, T. Oelschläger, U. Vinkemeier (2005). Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J. Biol. Chem.* **280**, 43087-43099.

Loppnow, H. (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist* **42**, 13-27.

Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, W. Reith (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 301-331.

Mao, X., Z. Ren, G.N. Parker, H. Sonderrmann, M.A. Pastorello, , W. Wang, J.S. McMurray, B. Demeler, J.E. Darnell Jr, X. Chen. (2005). Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol. Cell* **17**, 761-771.

Marg, A., Y. Shan, T. Meyer, T. Meissner, M. Brandenburg, U. Vinkemeier (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J. Cell Biol.* **165**, 823-833.

Massague, J. (2003). Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev.* **17**, 2993-2997.

Mattaj, I.W., L. Engelmeier (1998). Nucleocytoplasmic transport: The Soluble Phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:265–306.

McBride, K., G. Banninger, C. McDonald, N.C. Reich (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J.* **21**, 1754-1763.

Meissner, T., E. Krause, I. Lödige, U. Vinkemeier (2004). Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* **119**, 587-589.

Melen, K., L. Kinnunen, I. Julkunen (2001). Arginine/Lysine-rich structural element is involved in Interferon-induced nuclear import of STATs. *J. Biol. Chem.* **276**, 16447-16455.

Merez, M.A., J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. DuBois, R. Clark, M. Aguet, R.D. Schreiber (1996). Targeted disruption of the *Stat1* gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK–STAT signaling pathway. *Cell* **84**, 431-442.

Mertens, C.; M. Zhong, R. Krishnaraj, W. Zou, X. Chen, J.E. Darnell (2006). Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* **20**, 3372-3381.

Meyer, T., A. Begitt, I. Lödige, M. van Rossum, U. Vinkemeier (2002). Constitutive and IFN- γ -induced nuclear import of Stat1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* **21**, 344-354.

Meyer, T., A. Marg, P. Lemke, B. Wiesner, U. Vinkemeier (2003). DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* **17**, 1992-2005.

Meyer, T., U. Vinkemeier (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4606-4612.

Meyer, T., L. Hendry, A. Begitt, S. John, U. Vinkemeier (2004). A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of Stat transcription factors. *J. Biol. Chem.* **279**, 18998-19007.

Meyer, T., A. Begitt, U. Vinkemeier (2007). Green fluorescent protein-tagging reduces the nucleocytoplasmic shuttling specifically of unphosphorylated STAT1. *FEBS J.* **274**, 815-826.

Moriggl, R., D.J. Topham, S. Teglund, V. Sexl, C. McKay, D. Wang, A. Hoffmeyer, J. van Deursen, M. Sangster, K. Bunting, G. C. Grosveld, J.N. Ihle (1999). STAT5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* **10**, 249-259.

Mowen, K.A., J. Tang, W. Zhu, B.T. Schurter, K. Shuai, H.R. Herschman, M. David (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* **104**, 731-741.

Murphy, T.L., E.D. Geissal, J.D. Farrar, K.M. Murphy (2000). Role of the Stat4 N-domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7121-7131.

Nardozzi, J., N. Wenta, N. Yashuhara, U. Vinkemeier, G. Cingolani (2010). Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin α 5. *J. Mol. Biol.* **402**, 83-100.

Novick, D., B. Cohen, M. Rubinstein (1994). The human interferon α/β receptor: Characterization and molecular cloning. *Cell* **77**, 391-400.

Oates, A.C., P. Wollberg, S.J. Pratt, B.H. Paw, S.L. Johnson, R.K. Ho, J.H. Postlethwait, L.I. Zon, A.F. Wilks (1999). Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Dev. Dyn.* **215**, 352-370.

Ouchi, T., S.W. Lee, M. Ouchi, S.A. Aaronson, C.M. Horvath (2000). Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN- γ target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5208-5213.

O'Shea, J.J. (1997). Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: Are we there yet? *Immunity* **7**, 1-11.

Park, O.K., T.S. Schaefer, D. Nathans (1996). *In vitro* activation of STAT3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13704-13708.

Park, C., S. Li, E. Cha, C. Schindler (2001). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* **13**, 795-804.

Paulillo, S.M., E.M. Phillips, J. Koser, U. Sauder, K.S. Ullman, M.A. Powers, B. Fahrenkrog (2005). Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* **351**, 784-98.

Pascal, A., J.-F. Riou, C. Carron, J.-C. Boucaut, M. Umbhauer (2001). Cloning and developmental expression of STAT5 in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **106**, 171-174.

Paulson, M., S. Pisharody, L. Pan, S. Guadagno, A.L. Mui, D.E. Levy (1999). Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J. Biol. Chem.* **274**, 25343-25349.

Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat Rev Immunol.* **5**, 375-386.

Ramana, C., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen, G.R. Stark (2000). Complex roles of STAT1 in regulating gene expression. *Oncogene* **19**, 2619-2627.

Rawlings, J.S., K.M. Rosler, D.A. Harrison (2004). The Jak/STAT signaling pathway. *J. Cell Science* **117**, 1281-1283.

Schaefer, T., L. Sanders, D. Nathans (1995). Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 β , a short form of Stat3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9097-9101.

Schindler, C., X. Fu, T. Improt, R. Aebersold, J.E. Darnell, Jr. (1992a). Proteins of transcription factor ISGF-3: One gene encodes the 91- and 83-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7836-7839.

Schindler, C., K. Shuai, V.R. Prezioso, J.E. Darnell, Jr. (1992b). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**, 809-813.

Schindler, C., J.E. Darnell (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: The Jak-STAT-Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.

Schooltink, H., S. Rose-John (2002). Cytokines as therapeutic drugs. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 505-516.

Sekimoto, T., N. Imamoto, K. Nakajima, T. Hirano, Y. Yoneda (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J.* **16**, 7067-7077.

Shankaran, V., H. Ikeda, A. Bruce, J.M. White, P. Swanson, L. Old, R. D. Schreiber (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111.

Shi, Y., J. Massague (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.

Shuai, K., C. Schindler, V.R. Prezioso, J.E. Darnell, Jr. (1992). Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* **258**, 1808-1812.

Shuai, K., G.R. Stark, I.M. Kerr, J.E. Darnell, Jr. (1993a). A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science* **261**, 1744-1746.

Shuai, K., A. Ziemiecki, A. Wilks, A. Harpur, H. Sadowski, M. Gilman, J.E. Darnell. (1993b). Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* **336**, 580-583.

Shuai, K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Quereshi, D. Cowburn, J.E. Darnell. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* **76**, 821-828.

Shuai, K., J.Y. Liao, M.M. Song (1996). Enhancement of antiproliferative activity of γ interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Moll. Cell. Biol.* **16**, 4932-4941.

Shuai, K (2000). Modulation von STAT signalling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-2644.

Soler-Lopez, M., C. Petosa, M. Fukuzawa, R. Ravelli, J.G. Williams, C.W. Müller (2004). Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form. *Mol. Cell* **13**, 791-804.

Starr, R, D.J. Hilton (1999). Negative regulation of the Jak/STAT-Pathway. *BioEssays* **21**, 47-51.

Van de Stolpe, A., E. Caldenhoven, B.G. Stade, L. Koenderman, J.A. Raaijmakers, J.P. Johnson, P.T. van der Saag (1994). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor α -mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 6185-6192.

Strehlow, I., C. Schindler (1998). Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J. Biol. Chem.* **273**, 28049-28056.

Sung, S.-C., T.-J. Fan, C.-M. Chou, J.-H. Leu, Y.-L. Hsu, S.-T. Chen, Y.-C. Hsieh, C.-J. Huang (2003). Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish. *Eur. J. Biochem.* **270**, 239-252.

Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, S. Akira (1997a). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3801-3804.

Takeda, K., T. Kishimoto, S. Akira (1997b). STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J. Mol. Med.* **75**, 317-326.

Takeda, K., S. Akira (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological response. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 199-207.

Teglund, S., C. McKay, E. Schuetz, J. van Deursen, D. Stravopodis, D. Wang, M. Brown, S. Bodner, G. Grosveld, J.N. Ihle (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* **93**, 841-850.

Thomson, A. (1998). The cytokine handbook 3rd edn. *Academic Press, San Diego*.

Udy, G.B., R.G. Snell, R.J. Wilkins, S.-H. Park, P.A. Ram, D.J. Waxman, H.W. Davey (1997). Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7239-7244.

Vasilaki, E., M. Siderakis, P. Papakosta, K. Skourti-Stathaki, S. Mavridou, D. Kardassis (2009). Novel regulation of Smad3 oligomerisation and DNA binding by its linker domain. *Biochem.* **48**, 8366-8378.

Vinkemeier, U., I. Moarefi, J.E. Darnell, J. Kuriyan (1998). Structure of the aminoterminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* **279**, 1048-1052.

Vinkemeier, U. (2004). Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J. Cell Biol.* **167**, 197-201.

Wang, D., D Stravopodis, S. Teglund, J. Kitazawa, J.N. Ihle (1996). Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6141-6148.

Wang, G., J. Long, I. Matsuura, D. He, F. Liu (2005). The Smad3 linker region contains a transcriptional activation domain. *Biochem. J.* **386**, 29-34.

Weis, K. (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *TIBS*, **23**, 185-189.

Wen, Z., Z. Zhong, J.E. Darnell, Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.

Wenta, N., H. Strauss, S. Meyer, U. Vinkemeier (2008). Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9238-9243.

Wolff, B., J.J. Sanglier, Y. Wang (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**, 139-147.

Wurster, A.L., T. Tanaka, M.J. Grusby (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* **19**, 2577-2584.

Yan, R., S. Small, C. Desplan, C.R. Dearolf, J.E. Darnell, Jr. (1996). Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* **84**, 421-430.

Yang, E., Z. Wen, R.L. Haspel, J.J. Zhang, J.E. Darnell, Jr. (1999). The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5106-5112.

Yang, E., M. Henriksen, O. Schaefer, N. Kakharova, J.E. Darnell, Jr.. (2002). Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a Stat1 linker mutant. *J. Biol. Chem.* **277**, 13455-13462.

Yang, J., G.R. Stark (2008). Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* **18**, 443-451.

Zhang, J. J., U. Vinkemeier, W. Gu, D. Chakravarti, C.M. Horvath, J.E. Darnell, Jr. (1996). Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15092-15096.

Zhang, J.J., Y. Zhao, B.T. Chait, W.W. Lathem, M. Ritzi, R. Knippers, J.E. Darnell, Jr. (1998). Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1 α in IFN γ -induced transcriptional activation. *EMBO J.* **17**, 6963-6971.

Zhong, M., M.A. Henriksen, K. Takeuchi, O. Schaefer, B. Liu, J. ten Hoeve, Z. Ren, X. Mao, X. Chen, K. Shuai, J.E. Darnell (2005). Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3966-3971.

Zhu, M., S. John, M. Berg, W. Leonard (1999). Functional Association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell* **96**, 121-130.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in der kardiologischen Forschung und die Bereitstellung dieses hochinteressanten und weitreichenden Themas. Außerdem danke ich ihm für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit und das Vertrauen frei arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Essen danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die vielen hilfreichen Denkanstöße.

Herrn Prof. Dr. Maisch danke ich für die freundliche Aufnahme in die Kardiologie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Verena Koch für die Einarbeitung in einige von ihr etablierte Methoden, die sehr gute Zusammenarbeit, die Korrektur dieser Arbeit und die vielen wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche. Auch nach ihrem Weggang konnte ich sie jederzeit um Rat fragen, wobei sie gerne auf einen Kaffee vorbei kam.

Herrn Dr. Volker Ruppert danke ich ebenfalls für die sehr gute und herzliche Zusammenarbeit und seine Hilfe bei tierexperimentellen Fragen und Problemen.

Sarah König danke ich für ihre Unterstützung bei den letzten Versuchen für meine Doktorarbeit und auch für das ein oder andere nicht wissenschaftliche Gespräch.

Maik Veelders danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung der Kristallbilder. Außerdem danke ich ihm und Wolfgang Grosse herzlich für den ein oder anderen abwechslungsreichen Grill- und Spieleabend.

Bei den Arbeitsgruppen Herzchirurgie, Neurologie und Orthopädie bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Nutzung ihrer Laborgeräte, ihre Hilfsbereitschaft und die zahl-

reichen gemeinsamen Frühstücks- und Kaffeepausen. Die letzten Monate ohne sie waren sehr einsam.

Der Arbeitsgruppe Essen möchte ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen zu meinen in ihrem Seminar vorgetragenen Ergebnissen danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre immerwährende Hilfe und Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Christian, der mir seit unserer gemeinsamen Schulzeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und all meine Launen mit unendlicher Geduld ertragen hat.

Lebenslauf

Name: Julia Staab, geb. Polaczek
Geburtstag: 31. August 1981
Geburtsort: Homberg/ Efze
Adresse: Auf der Haide 1, 35043 Marburg

Ausbildung

seit 01/2008	Doktorarbeit in der Abteilung Kardiologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Dr. Meyer
01/2007-09/2007	Diplomarbeit mit dem Thema: „Funktions- und Strukturuntersuchungen an integralen Membranproteinen von <i>Helicobacter pylori</i> am Beispiel der Glucosepermease“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Essen am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
2001-2007	Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg
1992-2001	Theodor-Heuss-Schule, Homberg/ Efze

Anhang

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

American Psychosomatic Society 69th Annual Scientific Meeting, 9. - 12. März 2011 in San Antonio, USA: Deciphering interferon-induced signal pathways in depression through the study of hyper-phosphorylated STAT1 (Poster).

American Psychosomatic Society 69th Annual Scientific Meeting, 9. - 12. März 2011 in San Antonio, USA: Expressing mutant STAT1 transcription factor as an experimental approach for the study of interferon-induced signal transduction in depression (Poster).